



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2011

**DAVID ALEXANDRE
FERREIRA MACHADO**

**PERFIL O-GLICOSÍDICO DE GLICOPROTEÍNAS
URINÁRIAS EM CANCRO DE BEXIGA**



**DAVID ALEXANDRE
FERREIRA MACHADO PERFIL O-GLICOSÍDICO DE GLICOPROTEÍNAS
URINÁRIAS EM CANCRO DE BEXIGA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor José Alexandre Ribeiro de Castro Ferreira, Investigador de pós-doutoramento do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto) e do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família e amigos

O júri

Presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Doutor José Alexandre Ribeiro de Castro Ferreira

Investigador de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto).

Professor Doutor Celso Albuquerque Reis

Professor no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP).

Agradecimentos

Quero aqui expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que me permitiram de forma directa ou indirecta chegar à concretização desta dissertação.

Ao Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado e Professor Doutor Lúcio Lara Santos pelo voto de confiança em mim ao propor-me a realização deste Mestrado. Um agradecimento especial pelo incentivo, apoio, amizade e partilha de entusiasmos e desalentos.

Ao Professor Doutor Celso Reis, um muito obrigado pelo fornecimento do anticorpo.

Ao Professor Doutor Rui Vitorino e à Professora Doutora Rita Ferreira pela disponibilidade e simpatia durante a realização desta dissertação.

Ao Doutor José Alexandre Ferreira pela sua disponibilidade, simpatia e apoio que me permitiu desenvolver a autonomia e confiança necessária para a realização deste trabalho. Foi-se criando um forte laço de amizade ao longo do tempo, do qual resultou inúmeras horas de convivência levando isso a uma motivação extra. Com muito esforço, empenho e dedicação, apesar de muitas vezes ter-se “remado contra a maré” conseguiu-se cumprir o principal objectivo, e por fim “David venceu Golias”.

Aos meus pais quero expressar o meu agradecimento pela inestimável generosidade, ilimitada paciência, força, apoio e confiança constante depositada em mim para que este trabalho seja um sucesso. Ao longo deste tempo, senti-me inatingível, passei por maus momentos mas como sempre e graças à vossas constantes ajuda, tudo se superou. Um grande obrigado.

Ao meu irmão pela dor de cabeça que me causou ao longo da realização da dissertação mas apesar disso agradeço-lhe o apoio, encorajamento e motivação.

Aos meus avós pelo apoio, amor e carinho constante. Agradeço-lhes a inesgotável compreensão durante estes meses de ausência.

À minha tia Laura pelo carinho, apoio, força e motivação constante. Esteve sempre presente tanto nos bons como maus momentos passados.

Aos meus tios e primos pela ajuda, simpatia e permanente auxílio naquelas horas difíceis que nada corre bem.

Aos meus companheiros de casa, Rui Silva, Joana Pinto e Sónia Macedo pelo apoio, paciência, simpatia, incentivo e agradáveis convívios.

Aos meus companheiros de laboratório pelo apoio, paciência, amizade e motivação dispensada ao longo da execução deste trabalho.

Aos meus parceiros de bancada Igor Vieira, Patrícia Freire, e em especial à Andreia Almeida, pelo mútuo apoio, amizade, companheirismo e motivação.

Aos meus velhos amigos César Alhais, Philippe Figueiredo, José Lopes e Cristiana Ferreira, apesar da distância sempre estiveram presentes, agradeço-lhes pelo carinho, apoio, motivação e confiança depositada em mim.

Aos meus amigos, Márcio Cepeda, Nuno Loureiro, Ana Caetano, Cátia Santa, Gabriela Guerra, Luísa Dória, Miguel Ribeiro, Tiago Carvalho, Mírtila Alves, Lucila Sirna, Miguel Manso, Bárbara Manso, Marcelo Cruz, Jorge Oliveira, Liliana Pires, Luana Martins, Teresa Vicente, Ana Pereira e em especial à Tânia Costa pelo consistente apoio, carinho, motivação e principalmente por todo o encorajamento. Foram um importante incentivo nas horas mais árduas desta dissertação.

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...

Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

E

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas sim na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

(Fernando Pessoa)

Palavras-chave

Cancro de bexiga, biomarcadores urinários, glicosilação, O-glicosilação.

Resumo

O cancro de bexiga encontra-se em quinto lugar entre as neoplasias malignas mais prevalentes no mundo inteiro. A maioria são tumores papilares superficiais não-invasivos e, quando são detectados precocemente, a taxa de sobrevivência em cinco anos é de aproximadamente 94%. Portanto, a intervenção a tempo torna-se determinante neste caso. No entanto, a recidivação é frequente e encontra-se muitas vezes acompanhada pelo agravamento do grau do tumor ou mesmo da progressão em eventos metastáticos e invasão muscular. Como tal, tanto o diagnóstico precoce como a classificação histopatológica precisa são essenciais para o manipulação desta doença. Ainda assim, estão actualmente disponíveis biomarcadores moleculares com falta de sensibilidade e especificidade e, muitas vezes falham na classificação do tumor.

As transformações malignas são frequentemente acompanhadas por um desequilíbrio nas vias de glicosilação que resultam em glicosilações aberrantes, estas podem ser usadas para o diagnóstico e diferenciação do tumor. Reconhecendo estes factos, o presente trabalho tem como objectivo o estabelecimento de um perfil O-glicosídico para glicoproteínas urinária no cancro de bexiga. Para este estudo, foi utilizado a urina de doadores saudáveis do sexo masculino e de indivíduos com carcinomas papilares de alto grau, baixo grau e invasivos. As glicoproteínas urinárias foram N-desglicosiladas com PNGase F e as suas O-glicanas foram quimicamente libertadas pela β -eliminação reductiva e seguidamente caracterizadas em relação à sua composição em açúcares e perfil de ligações por GC-EI-qMS. Os resultados obtidos demonstram uma diminuição na expressão de epítomos de Le com o estadio tumoral. Estes eventos são acompanhados por um aumento no conteúdo de ácidos siálicos, que são mais pronunciados para estadios avançados. Estas alterações agora descritas para a urina de doentes com cancro de bexiga estão em concordância com observações feitas por outros autores ao nível do tecido. Adicionalmente, estudos de immunoblotting revelaram um aumento de expressão dos ácidos siálicos em ligação α 2,6 e epítomo associado a tumores sTn (Neu5Ac α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr). Estes resultados demonstram que a urina de doentes com cancro de bexiga apresenta um perfil O-glicosídico que reflecte transformações malignas na bexiga, principalmente em estadios mais avançados.

Keywords

Bladder cancer, urinary biomarkers, O-glycosylation.

Abstract

Bladder cancer ranks among the 5th most prevalent malignancies worldwide. The majority are superficial non-invasive papillary tumors and, when early detected, the 5-year survival rate is approximately 94%. Therefore, timely intervention is determinant. Nevertheless, recidivation is frequent and often accompanied by worsening of tumour grade or even progression into muscle invasive and metastatic events. As such, both early diagnosis and accurate histopathology classification are essential for the management of this disease. Still, currently available molecular biomarkers lack sensitivity and specificity and often fail in classifying the tumour.

Malignant transformations are frequently accompanied by an unbalance in glycosylation pathways that result in aberrant glycosylation that can be used for diagnosis and tumour differentiation. Acknowledging these facts, the present work was devoted to establishing an O-glycomic signature for urinary glycoproteins in bladder cancer. Urine from healthy male donors and patients with low- and high-grade and invasive urothelial cell carcinomas were elected for this study. Urinary glycoproteins were *N*-deglycosylated with PNGase F and the O-glycans chemically-released by reductive β -elimination and characterized in relation to their sugars composition and linkage profile by GC-El-qMS. Data highlights a decrease in Lewis epitope expression which is more pronounced in more aggressive and invasive tumors. These events are accompanied by an increase in sialic acids content, which are more pronounced for advanced stages, in agreement with previous reports concerning urothelial tumours. Additionally, immunoblot studies revealed an over expression of α 2,6 Neu5Ac and tumor-associated carbohydrate-antigen sTn (Neu5Ac α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr) in more advanced stages.

In overall, results thus suggest that the O-glycomic profile of urinary glycoproteins reflects malignant transformations in the bladder, particularly in advanced stages.

Índice

Índice	xiii
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xix
I. Introdução	- 3 -
I.I O-glicosilação e alterações em cancro.....	- 6 -
I.II Formação do antígeno Tn	- 8 -
I.III Formação do antígeno sTn	- 9 -
I.IV Alterações na extensão da cadeia de O-glicanas.....	- 10 -
I.IV.I Alterações no corpo glicosídico de tipo 1 (antígeno T).....	- 11 -
I.IV.II Alteração no corpo glicosídico 2 e corpo glicosídico 4	- 12 -
I.IV.III Alteração no corpo glicosídico 3.....	- 13 -
I.V Alterações na O-glicosilação como biomarcadores tumorais.....	- 14 -
I.VI Alterações no perfil de O-glicosilação no urotélio humano	- 15 -
I.VII Enquadramento do trabalho	- 16 -
II. Material e métodos.....	- 21 -
II.I Amostragem	- 21 -
II.II Determinação do perfil glicosídico.....	- 21 -
II.II.I Quantificação de proteína total e creatinina	- 22 -
II.II.II Isolamento de O-glicanas.....	- 23 -
II.II.III Composição em açúcares neutros	- 23 -
II.II.IV Quantificação de ácidos siálicos totais.....	- 24 -
II.II.V Determinação do padrão de ligações glicosídicas	- 24 -
II.II.VI Quantificação de α 2,6Neu5Ac e do epítipo sTn.....	- 24 -
II.II.VII Tratamento de dados.....	- 25 -
III. Resultados e discussão.....	- 29 -
III.I Avaliação dos níveis de proteinúria	- 29 -
III.II Avaliação dos níveis de açúcares totais.....	- 30 -

III.III	Avaliação dos açúcares neutros em relação aos padrões de razões.....	32 -
III.IV	Avaliação dos ácidos siálicos	33 -
III.V	Composição em <i>O</i> -glicanas	34 -
IV.	Conclusões e perspectivas futuras	47 -
V.	Referências bibliográficas.....	51 -

Índice de Figuras

Figura 1 – Vias biossintéticas das mais comuns <i>O</i> -glicanas do tipo mucinas. Adaptado da ref. ^[53]	- 7 -
Figura 2 – Complexo das glicanas <i>O</i> -GalNAc com estruturas dos corpos glicosídicos diferentes. Adaptado da ref. ^[52]	- 10 -
Figura 3 – Abordagem experimental realizada para este trabalho.	- 22 -
Figura 4 – Quantificação dos níveis de proteinúria em indivíduos controlo e indivíduos com diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo)....	- 30 -
Figura 5 – Quantificação dos níveis de açúcares totais em proteínas urinárias em indivíduos controlo e de diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).....	- 31 -
Figura 6 – Razão molar entre açúcares neutros presentes nas proteínas urinárias de indivíduos controlo e de diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).....	- 33 -
Figura 7 – Quantificação dos ácidos siálicos ligados nas amostras de indivíduos controlo e de diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).	- 34 -
Figura 8 – Razão de <i>O</i> -glicanas e açúcares totais de indivíduos controlo e indivíduos com diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).	- 35 -
Figura 9 – Razão molar das <i>O</i> -glicanas nos açúcares neutros para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).....	- 36 -

Figura 10 – Razão de ácidos siálicos e ácidos siálicos total para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs controlo).	- 37 -
Figura 11 – Quantificação dos epítomos de <i>Lewis</i> para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs controlo).	- 40 -
Figura 12 – Resíduos O-6 ligados para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs controlo).	- 41 -
Figura 13 – Quantificação de $\alpha 2,6\text{Neu5Ac}$ para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs controlo).	- 42 -
Figura 14 – Avaliação da expressão do epítomo sTn para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs controlo).	- 43 -

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Biomarcadores urinários de cancro de bexiga e respectivas sensibilidades e especificidade.....	- 4 -
Tabela 2 – Estrutura dos corpos glicosídicos <i>O</i> -glicanas.....	- 11 -
Tabela 3 – Glicosiltransferases específicas para glicanas <i>O</i> -GalNAc do tipo mucinas....	- 13 -
Tabela 4 – Análise do padrão de ligações (Terminal, Linear e Ramificado) de indivíduos controlo e de indivíduos em diferentes estadios tumorais.	- 38 -

Lista de Abreviaturas

AS – Ácido siálico

AST – Ácido siálico total

C2GnT1 – Corpo glicosídico 2 β 1-6*N*-acetilglucosamina transferase

Corpo glicosídico 1 – Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr

Corpo glicosídico 2 – GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Ser/Thr

Corpo glicosídico 3 – GlcNAc β 1-3GalNAc α Ser/Thr

Corpo glicosídico 4 – GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α Ser/Thr

Corpo glicosídico 5 – GalNAc α 1-3GalNAc α Ser/Thr

Corpo glicosídico 6 – GlcNAc β 1-6GalNAc α Ser/Thr

Corpo glicosídico 7 – GalNAc α 1-6GalNAc α Ser/Thr

Corpo glicosídico 8 – Gal α 1-3GalNAc α Ser/Thr

CU – Citologia urinária

D.O – Densidade óptica

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTT – Ditiotreitól

EI – Impacto electrónico

Fuc – Fucose

Gal – Galactose

GalNAc – *N*-acetilgalactosamina

GalT – Galactose-1-fosfato uridil transferase

GC – Cromatografia em fase gasosa

Glc – Glucose

GlcNAc – *N*-acetilglucosamina

GPI – Glicosilfosfatidilinositois

LacNAc – *N*-acetil-lactosamina

Le – *Lewis* [Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc]

Le^x – *Lewis* X [Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1]

Man – Manose

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

Neu5Ac – Ácido *N*-acetilNeuramínico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PNGase F – Peptidil-*N*-glicosidase F

ppGalNAcT – polipéptido *N*-acetilgalactosamina transferase

qTOF – Quadrupolo tempo de voo

sLe^x – Sialil *Lewis* X [NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc]

SNA – *Sambucus nigra*

sT – Sialil-T

sT3Gal-I – Corpo glicosídico 1 α 2-3Sialiltransferase

sT6GalNAc – α 2-6Sialiltransferase

sTn – Sialil-Tn (NeuAc α 2-6GalNAc α 1-Ser/Thr)

T – Antígeno T (Gal(β 1-3)GalNAc)

TBS – Tampão Tris Salino

TBS-T – Tampão Tris Salino com Tween 20

TFA – Ácido trifluoroacético

Tn – Antígeno Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr)

U.A – Unidades arbitrárias

UDPGalNAc – UDP-*N*-acetilgalactosamina

Xil – Xilose

I. Introdução

I. Introdução

Com uma estimativa de 70 980 novos casos diagnosticados e 14 330 mortes associadas em 2009, o cancro de bexiga foi considerado a segunda doença maligna geniturinária mais comum nos Estados Unidos. Neste momento, é igualmente considerado uma das cinco neoplasias mais frequentes em todo o mundo ^[1]. O carcinoma de células uroteliais é o subtipo mais prevalente de tumores da bexiga, (90% dos cancros de bexiga) ^[2]. Entre estes, mais de 80% dos casos correspondem a tumores papilares não-musculares invasivos (Ta ou T1), enquanto que os restantes são tumores invasivos (>T1). Os tumores papilares quando detectados precocemente, a taxa de sobrevivência em cinco anos é de aproximadamente 94%, e portanto, um diagnóstico e intervenção precoces, aumentam consideravelmente a taxa de sucesso do tratamento. Os tumores papilares são normalmente tratados por ressecção transuretral. No entanto, mais de 70% dos tumores tratados recidivam durante os dois primeiros anos, havendo a possibilidade de progressão da neoplasia para tumores invasivos. Assim, o diagnóstico precoce torna-se determinante para uma melhor gestão desta doença.

O diagnóstico e a monitorização do cancro de bexiga são realizados por cistoscopia e CU (citologia urinária) ^[3]. A cistoscopia identifica a maioria das lesões papilares, no entanto trata-se de uma técnica invasiva. Adicionalmente, a CU tem uma sensibilidade e especificidade moderadas para a detecção de cancro de bexiga de alto grau, mas a sua sensibilidade para o despiste/rastreio de tumores de baixo grau situa-se entre 4% a 31%, demasiado baixa se tivermos em conta que estes são os tumores que caracterizam a maioria dos casos do cancro de bexiga ^[4].

Embora a cistoscopia seja o método mais adoptado no diagnóstico e monitorização do cancro de bexiga, esta é uma metodologia invasiva. Deste modo, é de elevada importância o desenvolvimento de técnicas não-invasivas com elevada sensibilidade e especificidade ^[5-7].

Assim, a urina tem vindo a ser explorada em busca de biomarcadores tumorais que permitam o estabelecimento de métodos não-invasivos de diagnóstico/prognóstico para o cancro de bexiga. Tratando-se de um fluido de proximidade do tumor, este reflecte alterações que nele estão a ocorrer ^[8-13]. Tendo em conta este facto, a urina apresenta uma

menor complexidade do que o plasma sendo portanto o fluído eleito e mais aconselhado para o diagnóstico.

O uso de urina como fluído de diagnóstico tem a vantagem de ser de recolha fácil, indolor e de existir em abundância. São várias as moléculas apontadas para efeitos de diagnóstico utilizando o fluído urinário, algumas delas já clinicamente aprovadas, como a PMN-22 (proteína 22 da matriz nuclear) ^[14], o factor do complemento H ^[14,15], mucinas e antígenos carcinoembrionários de alto peso molecular ^[15] e cromossomas aneuploides ^[15]. Contudo, as sensibilidades e especificidades dos seus testes carecem ainda de melhorias.

Vários testes moleculares têm sido desenvolvidos para detectar possíveis moléculas associadas a tumores que são libertadas na urina por lesões malignas. Estes testes incluem o ATB (antígeno tumoral da bexiga) ^[16], PMN-22 ^[14,17-18], BLCA-4, CEACAM1 (antígeno carcinoembrionário relacionado com moléculas de adesão celular), citoqueratina ^[19], psoríase (S100A7) ^[20], fibronectina e seus produtos de degradação ^[21,22], zinco- α 2-glicoproteína ^[23], ácido hialurónico ^[14], hialuronase ^[14] e mais recentemente a mucina 16 (CA-125) ^[24] e a α 1-anti-tripsina ^[25] (**Tabela 1**).

No entanto, estes marcadores têm uma sensibilidade limitada, pelo que apenas estes ainda não sejam suficientes para substituir o padrão de ouro, nomeadamente a CU ou cistoscopia ^[26,27]. Por outro lado, muitos poderão igualmente estar presentes em outros quadros patológicos, podendo levar a um aumento do número de falsos positivos.

Tabela 1 – Biomarcadores urinários de cancro de bexiga e respectivas sensibilidades e especificidade.

Biomarcadores	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Referências
<i>Nuclear matrix protein 22</i> (PMN-22)	76-84	86-90	[15,18]
<i>Nuclear matrix protein 22</i> (PMN-22) ¹	55,7	85,78	[14]
Factor do complemento H e proteínas relacionadas (BTA stat test) ¹	60-70	72	[14,15]
<i>B-lymphocyte carcinoma cross-reacting antigen</i> (BLCA-4)	96,4	100	[28]
Citoqueratinas 8 e 18	65	92	[14,19]
Psoríase (S100A7)	-	-	[29]
<i>Bladder tumor fibronectin</i> (BTF)	72	82	[30,31]
<i>High molecular weight carcinoembryogenic antigen</i> e mucinas (ImmunoCyt teste) ¹	81	75	[14]
Cromossomas aneuploides (UroVysion test) ¹	71	94,5	[14]
Telomerase	62	96	[14]
Telomerase	80-83	-	[14]

Biomarcadores	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Referências
Survivina	64	93	[14]
Ácido hialurónico	83	90	[14]
Hialuronase	100	89	[14]
<i>Zinc-α2-glycoprotein</i> (ZAG)	-	-	[23]
Muc-16 (CA-125)	-	-	[24]
α 1-anti-tripsina	74	80	[25]
Sialil-Lewis ^a	94,4	36,9	[32]

^a Marcadores correntemente usados em diagnóstico clínico.

Contudo, a transformação neoplásica das células humanas é frequentemente acompanhada por uma profunda alteração na glicosilação de proteínas, com implicações na adesão celular, migração, proliferação e crescimento do tumor [33,34].

Como resultado, vários antigénios de hidratos de carbono de tumores associados, nomeadamente, Le^x (*Lewis*^x correspondente a 3-fucosil-*N*-acetil-lactosamina) e sLe^x (Sialil-*Lewis*^x), também têm sido explorados como marcadores urinários de malignidade urotelial com resultados promissores [35,36]. No entanto, ainda não se dispõe de um conhecimento aprofundado das alterações ao nível da glicosilação e das proteínas urinárias em casos de cancro de bexiga. Embora existam muitos artigos que citam a utilização de formas glicosiladas anormais no urotélio como método de diagnóstico, há pouca investigação sobre estes epítomos na própria urina de indivíduos com cancro [35,36]. Estudos preliminares realizados até ao momento envolvendo espécies glicosiladas, sugerem que o padrão de expressão de AS (ácidos siálicos) se encontra alterado em tumores de bexiga. Uma compreensão mais aprofundada dos fenómenos na génese destas alterações e o alargamento dos estudos a outras espécies glicosiladas poderá contribuir para o traçar de um perfil glicosídico de cancro de bexiga a explorar como biomarcador [37,38].

Existem já alguns estudos centrados na avaliação do potencial biomarcador de estruturas glicosiladas em cancro de bexiga. Particularmente, a quantidade de AST (ácidos siálicos totais) na urina aumenta de indivíduos controlo para indivíduos com cancro de bexiga [38]. Contudo, este aumento é pouco significativo e depende bastante de factores como a idade, o sexo e o estado de gravidez. Por outro lado, podem estar associados com outros quadros patológicos que não o cancro.

Em particular, alterações ao nível da *O*-glicosilação, nomeadamente epítomos glicosilados de baixo peso molecular, resultantes de biossíntese incompleta, têm vindo a ser exploradas como biomarcadores tumorais [39-51].

1.1 *O*-glicosilação e alterações em cancro

Uma das formas mais comuns de *O*-glicosilação nas proteínas de mamíferos é iniciada pela transferência de resíduos de GalNAc (*N*-acetilgalactosamina) para um grupo hidroxilo de uma serina ou de uma treonina de uma cadeia peptídica, dando origem ao antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr). As glicanas do tipo *O*-GalNAc, são frequentemente encontradas em mucinas, proteínas altamente glicosiladas que são os principais componentes do muco que recobre o epitélio da superfície luminal do tracto respiratório, gastrointestinal e reprodutivo. Contudo são igualmente comuns enquanto *O*-glicosilações de outras glicoproteínas [24].

No entanto podem ser encontrados, embora menos frequentemente, outros tipos de *O*-glicosilações, nomeadamente a α -*O*-fucose (Fuc), β -*O*-xilose (Xil), α -*O*-manose (Man), β -*O*-GlcNAc (*N*-acetilglucosamina), α - ou β -*O*-galactose (Gal), e α - ou β -*O*-glucose (Glc).

A formação de glicanas do tipo *O*-GalNAc dá-se preferencialmente no complexo de Golgi e é mediada por ppGalNAcT (polipéptidos *N*-acetilgalactosamina transferases), que determinam a densidade e locais de glicosilação. O antígeno Tn pode depois sofrer uma sialilação, isto é, a inserção de um Neu5Ac (ácido *N*-acetilNeuramínico) dando origem ao antígeno sTn (Sialil-Tn correspondente a NeuAc α 2-6GalNAc-O-Ser/Thr), terminando prematuramente a extensão da cadeia. Em alternativa, podem formar-se estruturas oligossacarídicas mais ou menos alongadas (corpos glicosídicos) dependendo da disponibilidade e especificidade das glicosiltransferases presentes. Há uma variação estrutural considerável nos corpos glicosídicos de *O*-glicanas do tipo *O*-GalNAc. Mais precisamente, foram já identificadas pelo menos oito estruturas de corpos glicosídicos diferentes em *O*-glicanas [40,52] (**Figura 1**).

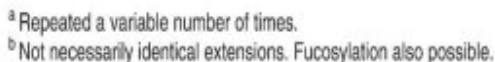


Figura 1 – Vias biossintéticas das mais comuns *O*-glicanas do tipo mucinas. Adaptado da ref. [53].

Estas estruturas podem ser subsequentemente sialiladas, entendidas por unidades de LacNAc (*N*-acetil-lactosamina), terminadas por antígenos de Le (*Lewis*) e determinantes de grupos sanguíneos. Podem ainda sofrer outras modificações pós-traducionais, nomeadamente fosforilações, sulfatações, acetilações e alquilações aumentando assim a complexidade das estruturas.

Vários factores foram já identificados como responsáveis pela regulação da actividade das glicosiltransferases envolvidas na formação de glicanas do tipo *O*-GalNAc. Estes incluem a concentração em iões metálicos, a presença de certas proteínas e lípidos que actuam como “chaperones”, e modificações pós-traducionais nas próprias enzimas [54]. Igualmente, os domínios peptídicos das proteínas alvo e a disponibilidade de resíduos de açúcares na proximidade dos locais de glicosilação também contribuem quer para a regulação do processo de iniciação quer para as etapas subsequentes de glicosilação. A determinação da sequência pela qual os açúcares são inseridos na cadeia glicosídica no

complexo de Golgi é igualmente controlada pela actividade das glicosiltransferases presentes. A presença de várias enzimas no mesmo compartimento tem por resultado fenómenos de competição e o produto resultante é determinado pela actividade relativa de cada uma delas.

As funções das glicosilações do tipo *O*-GalNAc são tão diversas quanto as suas estruturas. As *O*-glicanas protegem as proteínas subjacentes bem como as superfícies das células epiteliais, mantêm as conformações das proteínas, possuem o controle de epítomos activos e antigenicidades e participam na adesão celular ligando os micróbios e no sistema imunológico. Podem determinar a expressão da superfície celular e a função de receptores da superfície celular e podem estar envolvidos na regulação do crescimento. As *O*-glicanas também têm sido apresentadas como estando envolvidas na coagulação do sangue, embriogénese, desenvolvimento e morte celular [40,55].

I.II Formação do antígeno Tn

O primeiro passo da *O*-glicosilação da formação do tipo *O*-GalNAc é a transferência da *N*-acetilgalactosamina da UDP-GalNAc (UDP-*N*-acetilgalactosamina) para os resíduos de serina ou treonina, que é catalisada por um ppGalNAcT [56]. A localização de cada GalNAc transferase pode variar dependendo do tipo de célula e possivelmente também do estado de diferenciação da mesma. Os seus níveis de expressão variam consideravelmente entre os tipos de células e tecidos [56,57]. Todos os ppGalNAcTs ligam o UDP-GalNAc, mas muitas vezes, diferem em substratos de proteínas para quais transferem a GalNAc. Tais diferenças permitem que as ppGalNAcTs possam ser distinguidas [58]. Muitas ppGalNAcTs parecem ter uma relação hierárquica entre si, de tal forma que uma enzima não pode ligar a uma GalNAc até que uma serina ou treonina adjacente seja glicosilada por um ppGalNAcT diferente. Assim, a co-expressão na mesma célula de ppGalNAcTs com complementares, sobrepõe-se parcialmente a substratos aceitadores que provavelmente assegura a eficiência da glicosilação da *O*-GalNAc [56-57,59].

O antígeno Tn é invulgar em proteínas que apresentam este tipo de glicosilação. No entanto, é frequentemente encontrado em mucinas derivadas de tumores [60,61], o que sugere que a extensão de *O*-glicanas, além dos hidratos de carbono, é bloqueado em algumas células tumorais. Esta e outras glicoformas truncadas resultam de uma

desorganização das vias secretoras dos organelos e alterações na “maquinaria” da *O*-glicosilação enzimática que controlam a *O*-glicosilação. Existem referências que apontam que em células tumorais a localização das ppGalNAcTs possam estar alteradas [62]. Os primeiros estudos realizados neste domínio demonstraram que as ppGalNAcTs, entre outras enzimas, estão localizadas nos compartimentos *cis* e *medial* do complexo de Golgi, enquanto que as enzimas finais se encontram nas cisternas *trans* [63,64]. No entanto *Gille et al.* [65] reportou que a localização das ppGalNAcTs é dependente do estado fisiológico da célula e oscila entre o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático. No cancro, é verificado uma re-localização destas enzimas do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático, resultando numa desregulação do processo de *O*-glicosilação. Foi também descrito que poderá haver uma acumulação de GalNAc, substrato para as enzimas iniciadoras da cadeia, no domínio *trans* do complexo de Golgi. Tal, poderá resultar numa sobreexpressão de estruturas *O*-glicosiladas incompletas, em particular do antígeno Tn [55,66-67].

I.III Formação do antígeno sTn

A formação do antígeno sTn resulta da inserção de um ácido siálico na posição *O*-6 do resíduo de GalNAc do antígeno Tn. Este evento resulta numa paragem da extensão das *O*-glicanas e é pouco frequente em tecidos saudáveis, mas comum em transformações neoplásicas. Este epítipo foi encontrado sobreexpresso na maioria dos carcinomas gástricos [68], colo-rectal [42], ovário [69], mama [70] e pâncreas [71], ao passo que a expressão do sTn em tecidos normais é considerada pouco frequente [61,70-73]. Além disso, a expressão do sTn está associada à agressividade dos carcinomas e mau prognóstico [72,73]. Os mecanismos subjacentes ao aparecimento destas *O*-glicanas não são totalmente conhecidas e podem variar com o tecido. Um mecanismo descrito compreende o aumento do nível da actividade de um α 2,6-sialiltransferase que catalisa a transferência dos ácidos siálicos do CMP-Neu5Ac para o GalNAc *O*-ligado a resíduos de serina ou treonina de um polipéptido [74]. Estudos anteriores demonstraram que a expressão do antígeno sTn em células tumorais se deve à actividade das sT6GalNAc-I (α 2-6-sialiltransferases) [75]. A estrutura do produto do sTn não pode ser processada e, portanto, bloqueia a biossíntese de qualquer estrutura do corpo glicosídico e do seu alongamento posterior [76].

Um outro factor descrito como responsável pela sobreexpressão de epítomos Tn e sTn são mutações somáticas no *Cosmc*, um “chaperone” para a enzima do corpo glicosídico 1 β 1,3-galactosiltransferase, a enzima que controla a síntese comum do corpo glicosídico 1 da via da O-glicosilação [77-79]. Neste contexto, a acumulação do epítopo Tn e sTn seria um resultado da perda de capacidade de expressão do corpo glicosídico 1 e consequentemente da sua extensão. A expressão do epítopo sTn resultaria de uma sobreexpressão do sT6GalNAc. Os impactos biológicos resultantes da acumulação de sTn em células tumorais ainda não se encontram totalmente clarificados. No entanto, estudos demonstraram que os antígenos sTn podem desempenhar um papel no reconhecimento das células tumorais pelo sistema imunológico, protegendo as células metastáticas da degradação na corrente sanguínea [80].

I.IV Alterações na extensão da cadeia de O-glicanas

A partir do antígeno Tn podem formar-se diferentes corpos glicosídicos, tendo sido até ao momento identificadas oito estruturas base (**Tabela 2**) [52]. Os mais frequentes são os Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr (corpos glicosídicos 1), GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Ser/Thr (corpos glicosídicos 2), GlcNAc β 1-3GalNAc α Ser/Thr (corpos glicosídicos 3), e GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α Ser/Thr (corpos glicosídicos 4) (**Figura 2**).

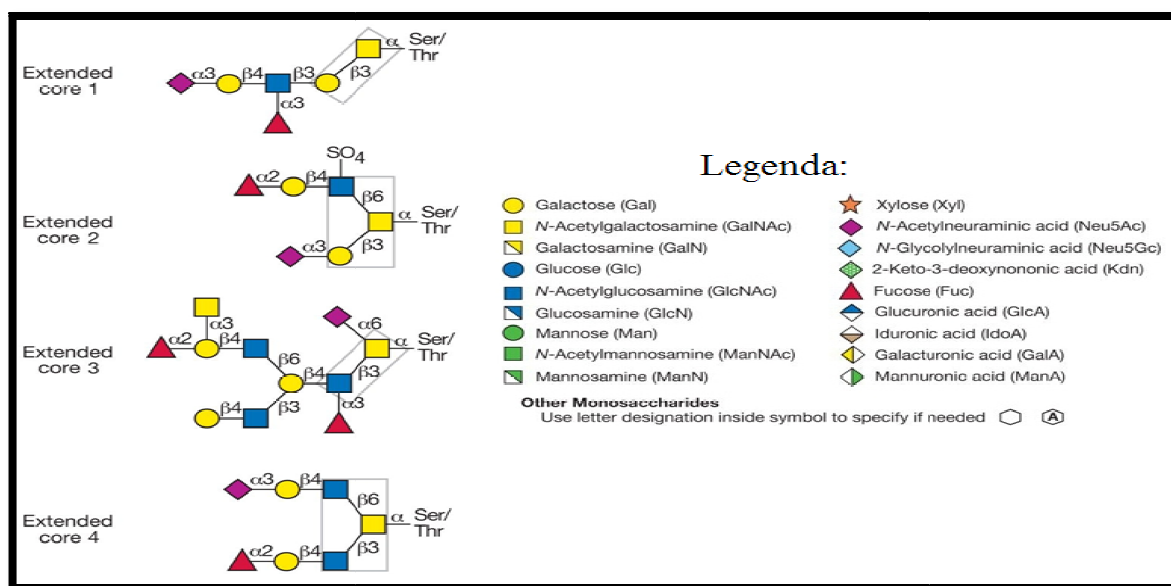


Figura 2 – Complexo das glicanas O-GalNAc com estruturas dos corpos glicosídicos diferentes. Adaptado da ref. [52].

Para além destes, outros quatro foram identificados: GalNAc α 1-3GalNAc α Ser/Thr (corpos glicosídicos 5), GlcNAc β 1-6GalNAc α Ser/Thr (corpos glicosídicos 6), GalNAc α 1-6GalNAc α Ser/Thr (corpos glicosídicos 7) e Gal α 1-3GalNAc α Ser/Thr (corpos glicosídicos 8).

Tabela 2 – Estrutura dos corpos glicosídicos *O*-glicanas.

O-Glicanas	Estrutura
Corpos glicosídicos	
Antigénio Tn	GalNAc α Ser/Thr
Antigénio Sialil-Tn	Sia α 2-6GalNAc α Ser/Thr
Corpo glicosídico 1 ou antigénio T	Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr
Corpo glicosídico 2	GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Ser/Thr
Corpo glicosídico 3	GlcNAc β 1-3GalNAc α Ser/Thr
Corpo glicosídico 4	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α Ser/Thr
Corpo glicosídico 5	GalNAc α 1-3GalNAc α Ser/Thr
Corpo glicosídico 6	GlcNAc β 1-6GalNAc α Ser/Thr
Corpo glicosídico 7	GalNAc α 1-6GalNAc α Ser/Thr
Corpo glicosídico 8	Gal α 1-3GalNAc α Ser/Thr

I.IV.1 Alterações no corpo glicosídico de tipo 1 (antigénio T)

A maioria das *O*-glicanas encontradas em glicoproteínas apresenta um corpo glicosídico de tipo 1, que resulta da adição de um resíduo de Gal à posição *O*-3 de um antigénio Tn. O corpo glicosídico 1, denominado também como antigénio T (Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr), encontra-se frequentemente substituído com ácidos siálicos ou outros açúcares. Desta forma, pode ser utilizado como base estrutural para a formação do epítopo sTn, visto serem estruturas alongadas de corpos glicosídicos tipo 1 e de tipo 2.

Nos mamíferos, a adição de uma Gal ao antigénio Tn é mediada por uma única C1GalT (galactose-1-fosfato uridil transferase) ^[79]. Trata-se de uma enzima ubíqua que ocorre na maioria das células de mamíferos e em muitas espécies. A sua actividade está presente na maioria dos tipos de células ^[79]. No entanto, como mencionado na secção anterior, esta glicosiltransferase exige um “chaperone” específico chamado *Cosmc*. O *Cosmc* é uma proteína do retículo endoplasmático, que uma vez exportado para o

complexo de Golgi, se liga especificamente à sintase T de forma a originar a forma activa da enzima. A ausência de síntese do corpo glicosídico 1 pode estar relacionada com um defeito da sintase T ou com a ausência do “chaperone” no *Cosmc* [77-80].

O antígeno T, enquanto estrutura terminal, é predominante em células tumorais e, em particular, nas proteínas por elas excretadas [81,82]. Nestes casos, é igualmente frequente a sialilação anormal destas estruturas, resultando num bloqueio da extensão do corpo glicosídico 1 e numa sobreexpressão do antígeno sTn. Tal efeito tem vindo a ser descrito como resultante de uma baixa ou ausente expressão da enzima C2GnT1 (Corpo glicosídico 2 β 1-6N-acetilglucosaminaltransferase), a enzima responsável pela conversão do corpo glicosídico 1 em corpo glicosídico 2 através da adição de um resíduo de GlcNAc à GalNAc. Associado a este fenómeno, tem-se verificado uma sobreexpressão de sT3Gal-I (Corpo glicosídico 1 α 2-3Sialiltransferase), responsável pela sialilação [83].

I.IV.II Alteração no corpo glicosídico 2 e corpo glicosídico 4

As O-glicanas de tipo 2 são estruturas ramificadas, resultantes da adição de um resíduo de GlcNAc em configuração β à posição O-6 de um resíduo de GalNAc de um corpo glicosídico 1. Esta reacção é mediada por uma de três β 1-6-N-acetilglucosaminaltransferases ou C2GnTs [84,85]. Estas enzimas são produzidas em muitos tecidos, nomeadamente no epitélio gástrico. A síntese do corpo glicosídico 2, as O-glicanas de GalNAc é regulada durante a activação de linfócitos, estimulação de citosinas e durante o desenvolvimento embrionário. Até ao momento, duas das enzimas responsáveis pela síntese do corpo glicosídico 2 já foram caracterizadas relativamente à especificidade de substrato e distribuição de tecidos [86]. Uma das enzimas responsáveis pela síntese do corpo glicosídico 2, nomeadamente a C2GnT-2, é também capaz de utilizar o corpo glicosídico 3 como substrato, e produzir a estrutura do corpo glicosídico 4 [84] (**Tabela 3**).

A sobreprodução de O-glicanas tendo por base estruturas de tipo 2 tem vindo a ser observada em diversos tumores relacionados com a sua progressão [87]. Por outro lado tem-se observado noutros casos uma sobreexpressão da sT3Gal-I responsável pela formação do epítipo sTn, impedindo a extensão do corpo glicosídico 2 [88].

Tabela 3 – Glicosiltransferases específicas para glicanas *O*-GalNAc do tipo mucinas.

Enzima	Forma curta
Polipéptido <i>N</i> -acetilgalactosaminotransferase	ppGalNAcT-1 a -24
Corpo glicosídico 1 β 1-3 galactosiltransferase	C1GalT-1 ou T sintase
Corpo glicosídico 2 β 1-6 <i>N</i> -acetilglucosaminaltransferase	C2GnT-1, C2GnT-3
Corpo glicosídico 3 β 1-3 <i>N</i> -acetilglucosaminaltransferase	C3GnT-1
Corpo glicosídico 2/4 β 1-6 <i>N</i> -acetilglucosaminaltransferase	C2GnT-2
Alongamento β 1-3 <i>N</i> -acetilglucosaminaltransferase	Alongamento β 3GnT-1 a -8
Corpo glicosídico 1 α 2-3 Sialiltransferase	sT3Gal I, sT3Gal IV
α 2-6 Sialiltransferase	sT6GalNAc I, II, III ou IV
Corpo glicosídico 1 3-O-sulfotransferase	Gal3ST4
Gene secretor α 1-2 fucosiltransferase	FucT-I, FucT-II

I.IV.III Alteração no corpo glicosídico 3

O corpo glicosídico 3 ocorre apenas nos tecidos especializados e está habitualmente limitado à mucosa do trato digestivo ^[89,90]. Este processo é mediado pelo corpo glicosídico 3 sintase β 3GlcNAc-T6, que transfere uma GlcNAc em configuração β para a posição *O*-3 de um resíduo de GalNAc. O corpo glicosídico 3 das *O*-glicanas é geralmente terminado por galactosilação e sialilação ou pela expressão de determinantes de grupos sanguíneos.

Foi demonstrado, que a expressão do corpo glicosídico 3 é drasticamente diminuída em tecidos tumorais. Na verdade, em contraste com os tecidos normais, o corpo glicosídico desaparece no cancro gástrico e colo-rectal ^[91,92]. As alterações estruturais ao nível dos corpos glicosídicos dão origem a alterações fenotípicas das células tumorais, tais como a mobilidade e a actividade metastática.

O corpo glicosídico 3 das *O*-glicanas, no entanto, foi encontrado truncado em tumores do cólon. Apesar de ser caracterizado como pouco regulado no cancro do cólon, pouco se sabe sobre a sua expressão em outros tipos tumorais ^[91]. No entanto, tem sido demonstrado que estruturas do corpo glicosídico 1 e do corpo glicosídico 2 podem ser sobreexpressos devido ao desaparecimento do corpo glicosídico 3 sintase, um dos seus competidores em tecidos tumorais ^[67]. Essa mudança favorece a síntese do corpo glicosídico 1 e pode explicar a prevalência do antígeno T no tecido tumoral. A perda da

sintase do corpo glicosídico 3 também pode desempenhar um papel importante para o aparecimento da glicoforma sTn, uma vez que a sintase do corpo glicosídico 3 compete para o substrato Tn utilizado pela sT6GalNAc -I para produzir a glicoforma sTn ^[74].

I.V Alterações na O-glicosilação como biomarcadores tumorais

O processo de O-glicosilação está comprometido em células cancerígenas e como consequência, ocorre a síntese de estruturas anormais de glicanas, como por exemplo o antígeno sTn. A síntese de estruturas incompletas deve-se ao *upregulation/downregulation* da actividade glicosiltransferase e também a uma mutação no gene que codifica a “chaperone” *Cosmc*. Estas estruturas aberrantes não são produzidas por células normais, o que as torna alvos muito promissores. Estas glicoformas anormais são visíveis na superfície das células tumorais, e portanto, são facilmente acessíveis a anticorpos ou lectinas ^[36]. Para além destas características, a secreção destas estruturas na corrente sanguínea torna-as potenciais biomarcadores no soro ^[36].

Em células normais, as O-glicanas truncadas podem existir como intermediários na biossíntese inicial que ocorre no complexo de Golgi, mas não estão expostas ao sistema imunológico, pois sofrerão passos de elongação. A sua exposição à superfície de células tumorais poderá desencadear a produção de anticorpos ^[93]. Algumas razões podem ser enumeradas para o estudo de métodos para a detecção de anticorpos: i) a resposta imunológica a antígenos associados a tumores ocorre num estadio inicial durante a carcinogénese e, portanto, os anticorpos podem ser detectados na fase assintomática do cancro ^[94]; ii) os anticorpos que têm origem no contacto com os antígenos associados a tumores são encontrados no soro dos indivíduos com cancro, onde são facilmente acessíveis ao rastreio; iii) Os anticorpos podem ser produzidos em concentrações relativamente elevadas mesmo que os antígenos se encontrem em baixa concentração; iv) Os anticorpos são inerentemente estáveis e persistem no soro por um período de tempo relativamente longo, porque eles geralmente não são submetidos aos diferentes tipos de proteólise observado em outras proteínas ^[95,96]. Consequentemente, eles podem ser detectados com métodos sensíveis e específicos na fase inicial ^[97].

As mucinas são a maior classe de O-glicanas estudadas e são densamente O-glicosiladas. Estas glicoproteínas apresentam um elevado peso molecular e zonas ricas com

serina, treonina e prolina, que são potenciais locais de *O*-glicosilação [98]. No cancro, as mucinas podem ser aberrantemente glicosiladas com estruturas de glicanas incompletas à superfície das células, nomeadamente sTn, Tn, T e sT (Sialil-T) [69,99].

Os ensaios serológicos são uma boa ferramenta para a detecção de moléculas produzidas por células tumorais e excretadas na corrente sanguínea. Existem ensaios serológicos que detectam estruturas de glicanas anormais, como mucinas aberrantemente glicosiladas [100,101] e epítomos anormais no cancro da mama [102], colo-rectal [103] e cancro dos ovários [100]. No entanto, todos os ensaios actuais têm características de baixa sensibilidade e especificidade na detecção precoce de cancro, mas são úteis na monitorização do tratamento e acompanhamento de recidivação.

I.VI Alterações no perfil de *O*-glicosilação no urotélio humano

O urotélio humano possui um padrão de expressão de glicosiltransferases diferente daquele reflectido pelo fenótipo eritrocitário do indivíduo. Por exemplo, antigénios Le^b são detectados em indivíduos com fenótipos Le(a+b-) [97,104-105]. Por outro lado, indivíduos expressando Le(a-b-), ao nível dos seus eritrócitos, expressam Le^a e Le^b no urotélio [104,105].

Tal como acontece em alguns carcinomas gástricos [106], colo-rectal [107], ovários [108], mama [109] e pâncreas [109], os tumores no urotélio exibem alterações do seu perfil de glicosilação. Em particular, encontra-se já bem estabelecido que a actividade das glicosiltransferases responsáveis pela formação de grupos sanguíneos do tipo α -3-*N*-acetil-D-galactosaminiltransferase (Tipo A) e α -3-D-galactosiltransferase (Tipo B) está suprimida. Este fenómeno é associado a uma predisposição para invasão e metastização. De acordo com Ørntof *et al.* [110], estas alterações enzimáticas devem-se a uma *downregulation* na expressão destas glicosiltransferases ao nível do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) [110].

No entanto, a actividade de outras enzimas, como por exemplo as fucosiltransferases envolvidas na formação de estruturas de Lewis, é descrita como essencialmente inalterada tanto em indivíduos Le⁺ como Le⁻. Como consequência, existe um aumento da expressão de estruturas como Le^x/Le^y e Le^a/Le^b. Em particular, estudos enzimáticos realizados até ao momento demonstraram que a actividade da α -2-L-fucosiltransferase se encontrava normal tanto nas células malignas de indivíduos secretores

como não-secretores, enquanto que a α -3-L-fucosiltransferase se apresentava reduzida em células de indivíduos Le⁺ [110]. Contudo, outros estudos referem que o padrão de expressão de Le poderá variar com o estadio tumoral. Nomeadamente, tumores papilares de alto grau foram caracterizados pela perda da capacidade para expressar Le^a, independentemente do fenótipo eritrocitário do indivíduo [110]. Tal, é acompanhado por uma acumulação de cadeias disfucosiladas de tipo 2, como é o caso do Le^b e do seu isómero posicional Le^y [111]. Um outro estudo descreve que a evolução para estadios tumorais mais avançados é acompanhado por uma perda de expressão de estruturas de Le [110,112].

Para além destes eventos, outros estudos têm apontado alterações particulares ao nível da O-glicosilação [113-115]. Em particular, *Inka et al.* [116] descrevem que a via de O-glicosilação na bexiga se encontra comprometida resultando num aumento de formas truncadas com a agressividade do estadio tumoral. Em particular, tem vindo a ser descritas que estas alterações resultam numa sobreexpressão do antígeno T no cancro de bexiga [111,117].

Adicionalmente, *Limas et al.* [118] descrevem que a expressão do antígeno T aumenta com a agressividade dos carcinomas de células uroteliais, estando particularmente elevada em estados invasivos. Este autor discute que a presença do antígeno T na superfície celular, se correlaciona com o potencial invasivo e elevado risco metastático.

I.VII Enquadramento do trabalho

Diversos trabalhos têm demonstrado que a carcinogénese urotelial é acompanhada por uma alteração na glicosilação de glicolípidos, proteoglicanos e glicoproteínas [119]. Algumas destas alterações, como é o caso da sobreexpressão de sialil-Le^a [32], Le^x (3-fucosil-*N*-acetil-lactosamina) e sLe^x, sialil-Le^x [119] e o aumento dos níveis de ácido hialurónico foram já apontados como potenciais marcadores urinários para cancro da bexiga. Contudo, embora existam evidências de alterações dos padrões de O-glicosilação do urotélio no cancro da bexiga [111,116-117], não existe qualquer estudo ao nível da O-glicosilação de proteínas urinárias. Assim, o presente trabalho tem como objectivo traçar um perfil glicosídico, e em particular a O-glicosilação, em glicoproteínas urinárias de doentes com tumores papilares de bexiga em diferentes estadios da doença. Pretende-se assim, contribuir para a definição de perfis glicosídicos que possam servir de base ao

estabelecimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos. A informação gerada contribuirá ainda para uma melhor compreensão das alterações na glicosilação de proteínas durante a carcinogénese urotelial.

II. Material e métodos

II. Material e métodos

II.I Amostragem

Foram colhidas 29 amostras de urina sem sinais visíveis de hematúria, de indivíduos com cancro de bexiga, do sexo masculino, com idades compreendidas entre 45 e 89 anos (idade média de 66 anos). Com base no diagnóstico citoscópico efectuado pelo Departamento de Urologia do Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto), os doentes foram classificados em três grupos, de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS): tumores papilares não-invasivos de baixo grau (Ta; n=15), papilares não-invasivos de alto grau (Ta-T1; n=8) e papilares com invasão muscular (T2-T4; n=6). Urinas de indivíduos masculinos assintomáticos (n=15), com idades compreendidas entre os 41 e os 82 anos (idade média de 61 anos) foram usadas como controlo. Todas as amostras recolhidas são provenientes de doentes com função renal normal e correspondem à primeira urina da manhã. As amostras foram colhidas para recipientes previamente esterilizados, seguidamente centrifugadas a 8000 x g durante 15 minutos, à temperatura de 4°C, tendo-se removido o *pellet* celular. As amostras foram, armazenadas a -80°C.

II.II Determinação do perfil glicosídico

O perfil glicosídico das proteínas urinárias e as suas *O*-glicosilações foram estabelecidos com base na estratégia experimental apresentada na **Figura 3**.

Brevemente, as urinas de indivíduos controlo e doentes com cancro de bexiga começaram por ser pré-caracterizadas quanto ao conteúdo de proteína, creatinina e composição em açúcares. Procedeu-se seguidamente à determinação do padrão de ligações glicosídicas dos açúcares nelas contidas e, com base nesta informação, foram seleccionados três indivíduos de cada grupo expressando epítomos de *Lewis* mono e difucosilados. Estas *pools* foram posteriormente utilizadas para estabelecimento de um perfil de *O*-glicosilação. As *pools* assim construídas foram *N*-desglicosiladas com PNGase F (peptidil-*N*-glicosidase F) e as suas *O*-glicanas libertadas por β -eliminação redutora. O perfil de *O*-glicosilação das *pools* foi determinado com base na composição em açúcares e

padrão de ligações glicosídicas. Adicionalmente, urinas *N*-desglicosiladas com PNGase F foram avaliadas em relação à sua composição em a2,6Neu5Ac por *slot blot* usando a lectina SNA (*Sambucus nigra*). Procedeu-se ainda à avaliação da expressão de epítomos sTn por *slot blot* com o anticorpo monoclonal de ratinho TKH2.

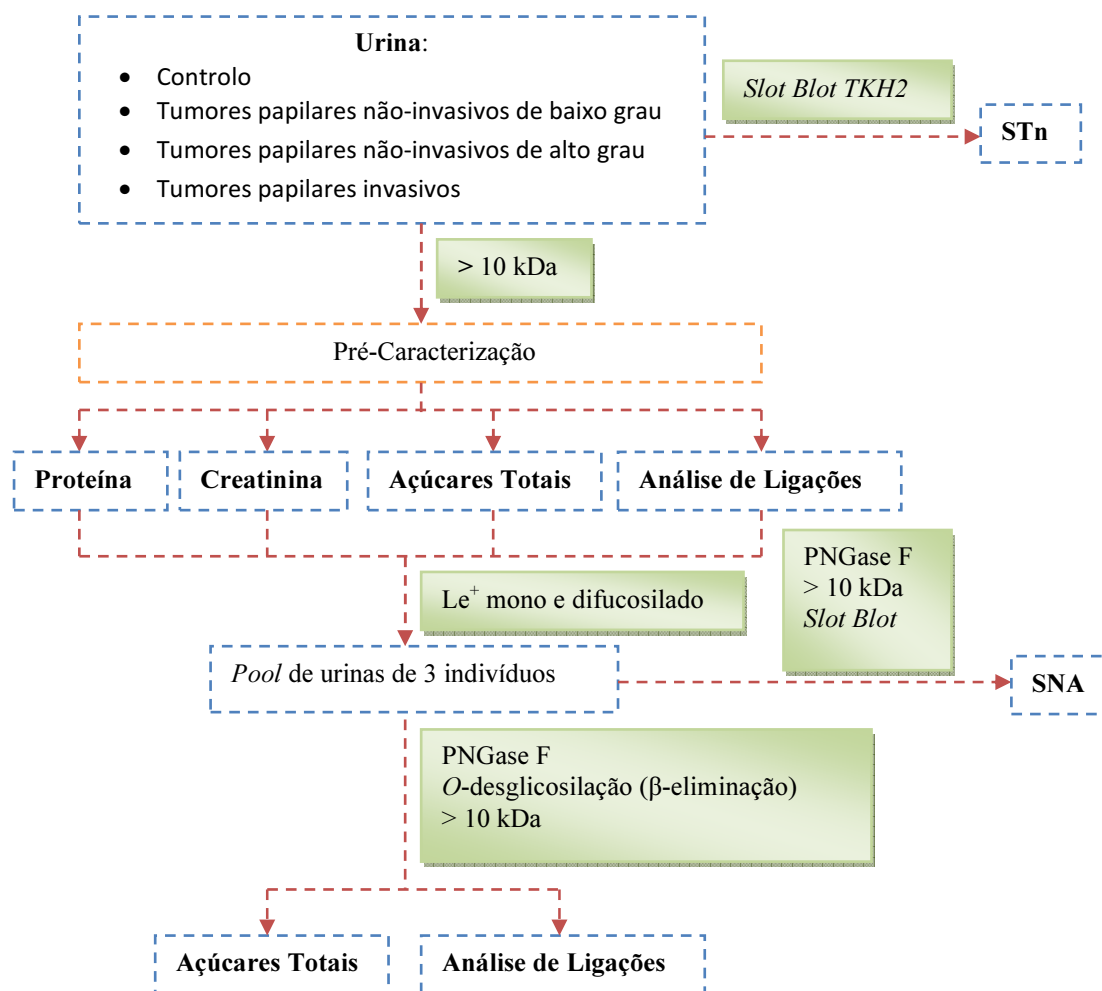


Figura 3 – Abordagem experimental realizada para este trabalho.

II.II.I Quantificação de proteína total e creatinina

A concentração de proteínas total foi determinada com o kit comercial RC-DC (Bio-Rad) que se baseia no método de *Lowry* modificado. Paralelamente, efectuou-se uma curva de calibração utilizando albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich) como proteína padrão. A creatinina foi determinada usando um *kit* de quantificação de creatinina (BioVision).

II.II.II Isolamento de O-glicanas

As proteínas urinárias foram isoladas por filtração usando filtros de 10 kDa e recuperadas do filtro usando uma solução de 50 mM NH_4HCO_3 .

As O-glicanas foram isoladas a partir das proteínas urinárias por β -eliminação após N-desglicosilação. Brevemente, as amostras foram reduzidas com 10 mM de DTT durante 37°C durante 30 minutos, alquiladas com 50 mM iodoacetamida à temperatura ambiente durante 30 minutos e N-desglicosiladas usando PNGase F recombinante de *Elizabethkingia miricola* (Sigma-Aldrich). As proteínas urinárias enriquecidas em O-glicanas foram isoladas por filtração usando filtros de 10 kDa. Seguidamente, procedeu-se à O-desglicosilação das amostras por β -eliminação redutora após tratamento das amostras com 50 mM NaBD_4 e 1M NaOH durante 16 horas a 40°C de acordo com o descrito por Packer *et al.* ^[120].

II.II.III Composição em açúcares neutros

A composição em açúcares das proteínas urinárias e das suas O-glicanas foi determinado por derivatização a acetatos de alditol e analisado por GC-EI-qMS (Agilent Technologies) segundo o descrito por Ferreira *et al.* ^[121].

Brevemente, as glicanas nas amostras foram hidrolisadas a monossacarídeos por tratamento com 4 M TFA a 110°C durante 3 horas, reduzidas a alditois por tratamento com 15% NaBH_4 durante 1 hora a 30°C e acetiladas com anidrido acético usando metilimidazol como catalisador durante 30 minutos a 30°C. Os acetatos de alditol resultantes foram recuperados na fase orgânica resultante de uma extracção com $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). A fase orgânica foi seguidamente lavada com água e levada à secura. Os acetatos de alditol foram posteriormente recuperados em acetona e analisados por GC-EI-qMS (Agilent Technologies) em modo positivo usando 2-desoxiglucose como padrão interno. As amostras foram injectadas em modo *splitless* num injector a 220°C e separadas numa coluna capilar DB-35MS (25 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno, 0.05 μm de espessura) usando hélio como gás de arraste e o seguinte programa de temperaturas: 80°C (9 min) – 10°C/min – 120°C (1 min) – 0.5°C/min – 150°C/1 min – 10°C/min. 320°C /5 min. Os iões gerados por EI foram detectados no modo positivo. Os resultados foram normalizados em relação aos níveis de creatinina nas amostras.

II.II.IV Quantificação de ácidos siálicos totais

A quantificação de ácidos siálicos totais foi previamente feita como descrito por *Matsuno e Suzuki* ^[122]. O conteúdo em ácidos siálicos nas amostras foi determinado por adição oxidação dos mesmos com 20 µL de solução de 10 mM periodato de sódio durante 45 minutos, em banho de gelo. A reacção foi terminada pela adição de 100 µL de 50 mM tiosulfato de sódio, tendo-se seguidamente promovido a formação de um fluoróforo através da adição de 500 µL de 4 M acetato de amónia (pH 7,5) e 400 µL de solução etanólica de acetoacetanilida. Após uma incubação de 10-20 minutos, à temperatura ambiente, mediu-se, contra um branco, a fluorescência emitida a 471 nm, com um comprimento de onda de excitação de 388 nm. A concentração de ácidos siálicos na amostra foi determinada com base numa curva de calibração construída com Neu5Ac (0-1.6 mg/mL). Os resultados foram normalizados em relação aos níveis de creatinina nas amostras.

II.II.V Determinação do padrão de ligações glicosídicas

O padrão de ligações glicosídicas dos diferentes açúcares presentes nas amostras estudadas foi determinado por derivatização das amostras a acetatos de alditol parcialmente metilados segundo o descrito por *Ferreira et al.* ^[121].

Brevemente, as amostras foram permetiladas em DMSO/NaOH à temperatura ambiente durante 3 horas. Seguidamente, foram metiladas com iodeto de metilo e recuperadas na fase orgânica resultante de uma extracção líquido-líquido com CH₂Cl₂:H₂O (1:1). A fase orgânica foi seguidamente lavada três vezes com água e levada à secura. Os açúcares parcialmente metilados foram seguidamente hidrolisados, reduzidos com NaBD₄ e acetilados segundo o descrito na secção II.II.III deste documento e analisados por GC-EI-qMS nas condições apontadas.

II.II.VI Quantificação de α2,6Neu5Ac e do epítipo sTn

Os níveis de α2,6Neu5Ac e epítipo sTn foram avaliados por *slot blot*. A expressão de α2,6Neu5Ac foi determinada por incubação com a lectina biotinilada *Sambucus nigra* (SNA, Vector Laboratories) numa concentração de 0.1 µg/ml em tampão Tris salino (TBS,

100 mM Tris, 1.5 mM NaCl, pH 8.0) directamente em 5 µg (5 mM em TBS) de proteínas urinárias previamente *N*-desglicosiladas com PNGase F. O epítipo sTn foi determinado directamente em 100 µL de urina com base na reactividade das amostras com anticorpo primário monoclonal *TKH2* de hibridoma de ratinho.

Brevemente, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose previamente activada (Whatman, Protran; porosidade 0.45 µm), usando para o efeito o aparelho *Hybri-slot* (21052-014; Gibco BRL, Life Technologies). De seguida, a membrana foi lavada 5 minutos em TBS e procedeu-se ao bloqueamento dos locais de ligação não específicos com uma solução de Carbo-Free Blocking Solution (SP-5040, Vector Laboratories) 1:10 em tampão Tris salino (TBS; Tris 100 mM pH 8,0 com NaCl 1,5 mM), durante 1 hora à temperatura ambiente. A membrana foi seguidamente incubada com SNA e *TKH2* para α2,6Neu5Ac e sTn respectivamente, durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram depois lavadas em tampão Tris salino com Tween 20 (TBS-T, TBS contendo 0.5% de Tween 20] para retirar o excesso de lectina/anticorpo. Seguidamente as amostras de SNA foram incubadas com VECTASTAIN® ABC (peroxidase, PK-6100, Vector Laboratories) durante 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras de sTn foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-ratinho IgG1 (1:15000 em solução de bloqueamento, Johnson ImmunoResearch) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens com TBS-T, as membranas foram tratadas com reagentes de quimioluminescência (reagentes ECL; Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante, e expostas a um filme de raio-X (Kodak Biomax Light Film, Sigma-Aldrich). Depois de revelado, o filme foi digitalizado num Molecular Imager Gel Doc XR+ System (Bio-Rad) e analisado com o software QuantityOne (Bio-Rad). O sinal resultante foi normalizado em relação aos níveis de creatinina na amostra.

II.II.VII Tratamento de dados

Todos os resultados apresentados nesta tese resultam da média de três ensaios independentes (n=3). Os diferentes grupos estudados foram comparados entre si e com os respectivos controlos com base em testes T de *student*. Este parâmetro estatístico bem como os gráficos apresentados ao longo da tese foram realizados usando o programa GraphPrism (GraphPad software) versão 5.0.

III. Resultados e discussão

III. Resultados e discussão

O presente trabalho tem como principal objectivo identificar alterações no perfil *O*-glicosídico de proteínas urinárias em cancro de bexiga. Neste contexto, foram estudadas urinas de indivíduos controlo caracterizados pela ausência de doença e indivíduos com tumores papilares não-invasivos de baixo grau, alto grau e tumores papilares invasivos. Todas as amostras consideradas neste estudo têm origem em indivíduos do sexo masculino. Para o estudo de tumores papilares, escolheram-se indivíduos com idades compreendidas entre os 45 e os 89 anos de idade (idade média de 66 anos), enquanto que para a avaliação de indivíduos saudáveis com função renal normal, seleccionaram-se idades entre os 41 e os 82 anos (idade média de 61 anos). A função renal foi avaliada pelos níveis de creatinina e proteína total no plasma e urina. Adicionalmente, foram apenas consideradas amostras que não apresentavam sinais visíveis de hematúria.

Primeiramente, realizou-se uma pré-caracterização destas amostras baseada na avaliação dos níveis de proteinúria, determinação da composição em açúcares e perfil de ligações glicosídicas. Os resultados obtidos foram normalizados com os níveis de creatinina das mesmas amostras descritas acima.

III.1 Avaliação dos níveis de proteinúria

A proteína total foi quantificada com o objectivo de caracterizar as amostras e relacionar a quantidade de proteína total com a quantidade de açúcares totais, apresentados na secção seguinte.

Pela análise do gráfico da **Figura 4**, os níveis totais de proteína não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos controlos e os indivíduos com tumores papilares não-invasivos de baixo grau. Observa-se também um aumento significativo da proteinúria em estadios mais avançados (tumores papilares não-invasivos de alto grau e tumores papilares invasivos) em relação aos tumores papilares não-invasivos de baixo grau e controlo. No entanto, não foi possível, com base neste critério, distinguir o grupo de indivíduos com tumores papilares não-invasivos de baixo grau em relação aos doentes com tumores papilares invasivos. Estes resultados estão em concordância com um

estudo por *Boman et al.* ^[123], onde é descrito um aumento dos níveis de proteína na urina com a agressividade do tumor. Contudo, um outro estudo por *Johansson et al.* descreve a ausência de uma relação entre os níveis de proteinúria e o estadio tumoral apresentado na urina de doentes ^[124].

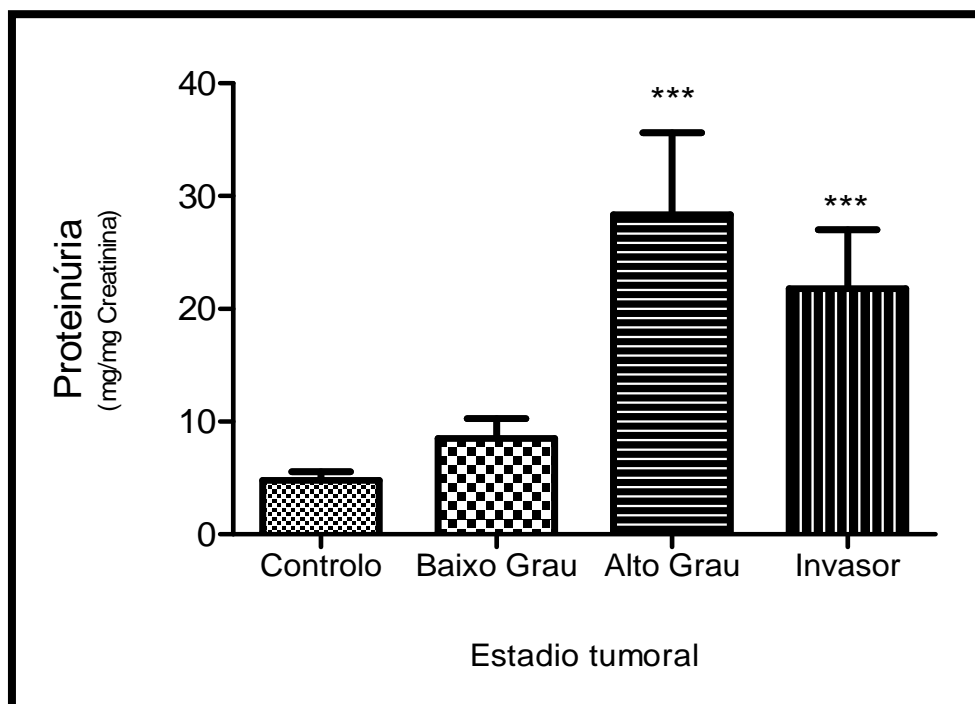


Figura 4 – Quantificação dos níveis de proteinúria em indivíduos controlo e indivíduos com diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

III.II Avaliação dos níveis de açúcares totais

Em seguida, procedeu-se ao isolamento de proteínas urinárias usando filtros com *cutoff* de 10 kDa. Procedeu-se à quantificação de açúcares totais nas amostras, compreendendo a determinação de açúcares neutros característicos de diversos glicoconjugados encontrados nas células humanas (Fuc, Xil, Man, Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc) e ácidos siálicos. Os açúcares neutros foram quantificados por GC-EI-qMS após hidrólise ácida e derivatização dos grupos hidroxilo aos respectivos acetatos de alditol. Os ácidos siálicos totais foram quantificados por fluorescência após oxidação selectiva dos grupos hidroxilo vicinais a aldeídos e reacção dos mesmos com acetoacetanilida.

Esta abordagem revelou um aumento, embora não estatisticamente significativo, do nível de açúcares totais na urina dos doentes com tumores papilares não-invasivos de baixo grau em relação aos indivíduos controlo (**Figura 5**). Contudo, com a agressividade dos tumores papilares de alto grau e invasivos, verifica-se um aumento significativo da excreção urinária de açúcares poliméricos. Este parâmetro acompanha o padrão dos níveis de proteinúria observados no gráfico da **Figura 4**, sugerindo um aumento da excreção de glicoproteínas urinárias, que se torna mais acentuado para tumores mais agressivos. Estas observações estão em linha com o aumento dos níveis de vários tipos de estruturas glicosiladas na urina de doentes com cancro de bexiga, nomeadamente ácidos siálicos [37,38], ácido hialurónico [14], e forma sialiladas de Le^x e Le^a com a agressividade dos tumores [119].

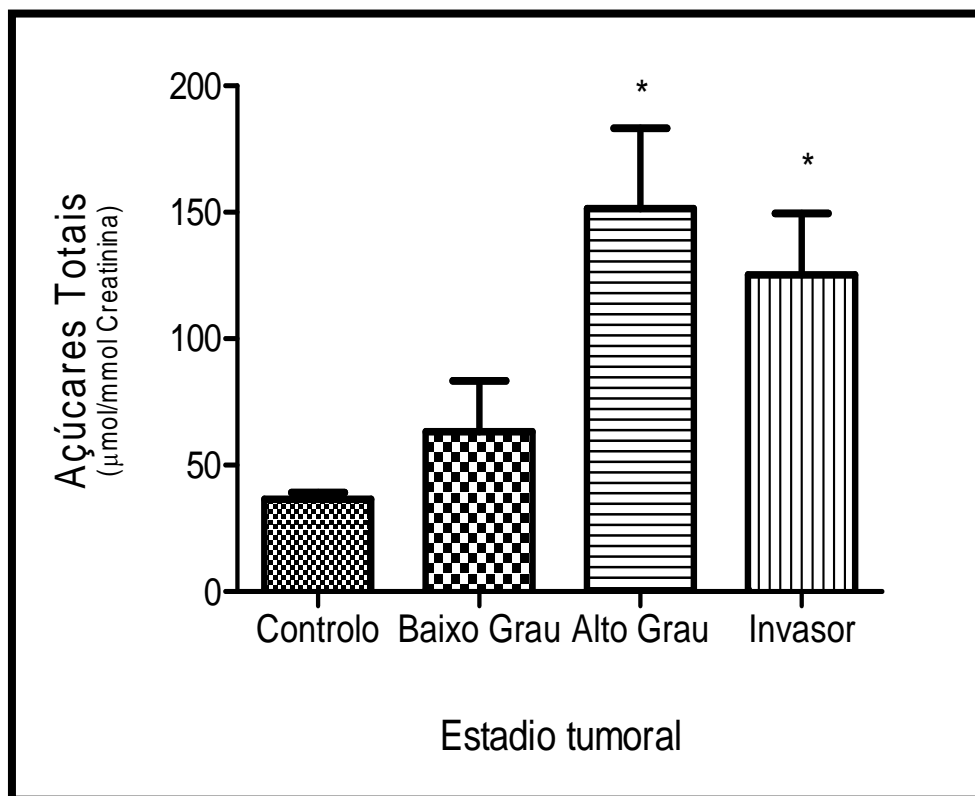


Figura 5 – Quantificação dos níveis de açúcares totais em proteínas urinárias em indivíduos controlo e de diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

III.III Avaliação dos açúcares neutros em relação aos padrões de razões

Com base nas análises por GC-EI-qMS, estabeleceu-se razões molares para cada um dos açúcares neutros (Fuc, Xil, Man, Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc) encontrados nas amostras de indivíduos controlos e de indivíduos portadores de tumores papilares (**Figura 6**).

O gráfico da **Figura 6** mostra uma predominância de Fuc, Glc, Gal e GlcNAc, característicos de diversas classes de glicoconjugados, nomeadamente glicoproteínas, proteoglicanos e glicosfingolípido ^[52]. Observa-se, em menor percentagem Man, que poderá ter a sua origem em *N*-glicanas, proteínas exibindo *O*-manosilações bem como GPI (glicosilfosfatidilinositois) ^[52]. Foi ainda identificada Xil sugerindo a expressão de proteoglicanas, bem como GalNAc, normalmente presente em *O*-glicosilações, glicosfingolípido, bem como em indivíduos expressando determinantes do grupo sanguíneo de tipo A ^[52]. Estes dados sugerem a presença de um conjunto de açúcares poliméricos na urina, que poderão ter origem em diferentes classes de glicoconjugados.

Os resultados apresentados no gráfico da **Figura 6** apresentam uma elevada variabilidade, tornando difícil o estabelecimento de padrões de glicosilação. Contudo, os dados sugerem, um aumento da Fuc nas urinas de doentes com tumores papilares com baixo grau em relação ao controlo. O conteúdo em Fuc decresce com o aumento de agressividade do tumor. Tal, sugere uma diminuição na fucosilação de glicoproteínas urinárias em tumores mais agressivos, consistente com as observações feitas anteriormente resultante da perda de expressão de estruturas de *Lewis* ^[110-111].

No gráfico da **Figura 6** é igualmente observável uma diminuição nos níveis de Man nas urinas dos doentes. No entanto, este decréscimo apenas se revela estaticamente significativo em relação ao controlo para tumores invasivos. Estas observações contudo parecem não estar relacionadas com um decréscimo na expressão de *N*-glicanas. São antes explicáveis por um aumento generalizado de Gal e GlcNAc nos estádios mais avançados, sugerindo um aumento da expressão de cadeias de LacNAc. Com base no estado da arte actual sobre glicobiologia tumoral ^[52] será de supor que tal se poderá justificar com um aumento dos níveis de glicosfingolípido na urina e/ou um aumento da ramificação de *N*-glicanas.

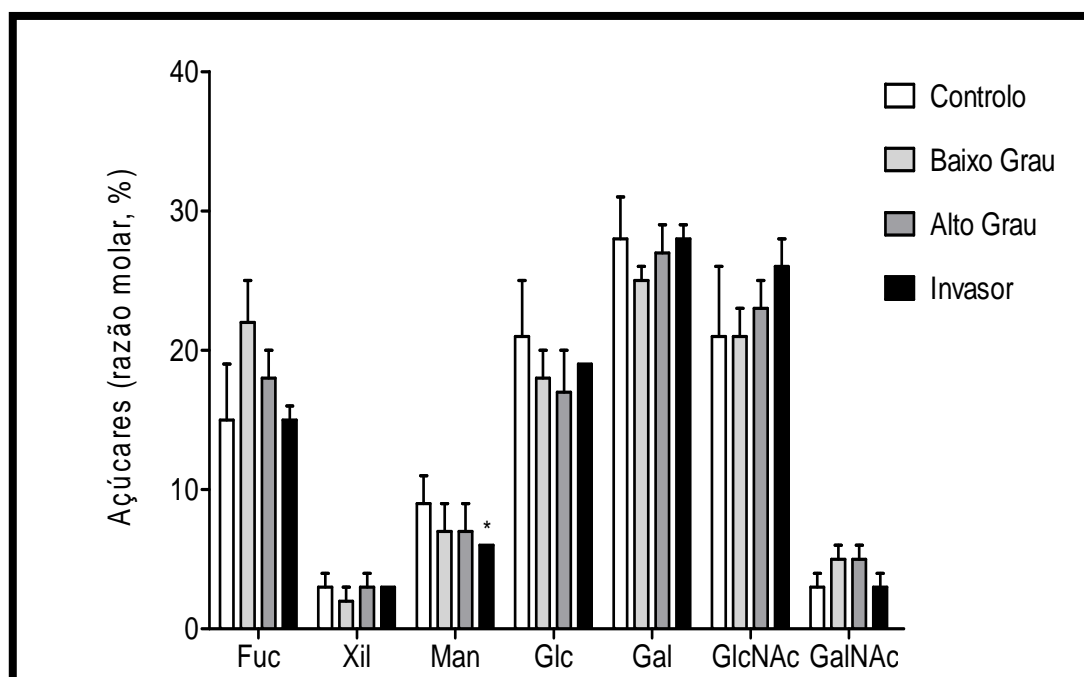


Figura 6 – Razão molar entre açúcares neutros presentes nas proteínas urinárias de indivíduos controlo e de diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

III.IV Avaliação dos ácidos siálicos

Para além da avaliação dos açúcares neutros no estadio tumoral, as glicoproteínas urinárias apresentaram ainda alterações nos níveis de ácidos siálicos (**Figura 7**).

Considerando que um aumento em formas sialiladas é característico de vários tumores ^[52], mediu-se a quantidade de ácidos siálicos totais na urina de indivíduos controlo e de três indivíduos em estadios tumorais diferentes (não-invasivos de baixo e alto graus e invasivos). Os resultados foram expressos em ácidos siálicos totais e normalizados á creatinina e apresentados no gráfico da **Figura 7**. Verificou-se que os ácidos siálicos totais aumentaram na urina de indivíduos com tumores papilares na bexiga (**Figura 7**) em relação aos indivíduos saudáveis. Este aumento é maioritariamente evidenciado nos estadios mais agressivos do tumor (não-invasivos de alto grau e invasivos). Estas observações encontram-se de acordo com Akçay *et al.* ^[125] que demonstra um aumento da excreção urinária de ácidos siálicos em indivíduos com tumores de bexiga em paralelo com o aumento do estadio tumoral.

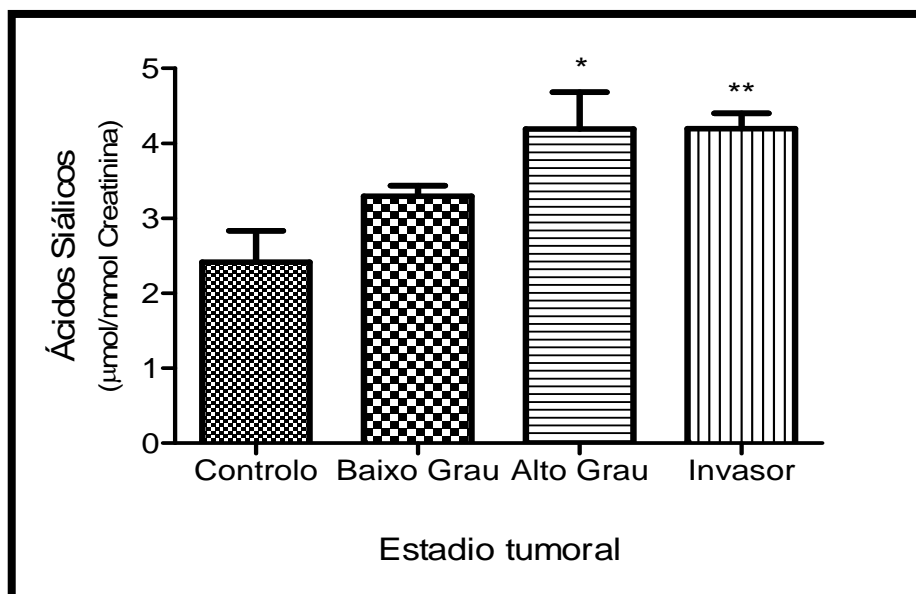


Figura 7 – Quantificação dos ácidos siálicos ligados nas amostras de indivíduos controlo e de diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

Seguidamente, as amostras foram submetidas a uma análise dos açúcares relativamente ao padrão de ligações glicosídicas por GC-EI-qMS após derivatização a acetatos de alditol parcialmente metilados. Com base no padrão de ligações, foram seleccionados indivíduos apresentando percentagens molares relativas de *O*-2Gal e *O*-3,4GlcNAc superiores a 1%, um perfil consistente com a expressão de determinantes mono e difucosilados de *Lewis*. Estes indivíduos foram seguidamente utilizados na construção de *pools* que serviram de base ao estabelecimento de um perfil O-glicosídico.

III.V Composição em O-glicanas

Inicialmente, as amostras foram tratadas com PNGase F para promover a eliminação das *N*-glicanas. Seguidamente as *O*-glicanas foram libertadas por β -eliminação redutora e submetidas a uma análise de açúcares.

Pela observação do gráfico da **Figura 8**, conclui-se que as *O*-glicanas constituem aproximadamente 20% do total de açúcares encontrados nas proteínas urinárias de indivíduos controlo. Já em casos com tumores papilares, este valor aumenta para aproximadamente 30-45%, logo, significativamente superiores aos encontrados nos indivíduos controlo.

Esta sobreexpressão ao nível da *O*-glicosilação é responsável por um aumento na quantidade de açúcares totais observado para as amostras não enriquecidas em *O*-glicanas. No entanto, embora os dados demonstrem um aumento nos níveis de *O*-glicosilação das proteínas urinárias em tumores papilares do urotélio, observa-se uma tendência de decréscimo para estadios tumorais mais avançados. Tais observações parecem denotar um decréscimo nos níveis de açúcares provenientes destas estruturas, em linha com observações já feitas no urotélio ^[111,113-117]. Estas alterações prendem-se com a perda de expressão de determinantes de grupos sanguíneos ^[113], epítomos de Le ^[97,104-105,125] e formação de epítomos de baixo peso molecular como o antígeno T ^[111,117], observadas como mais acentuadas em estadios mais avançados.

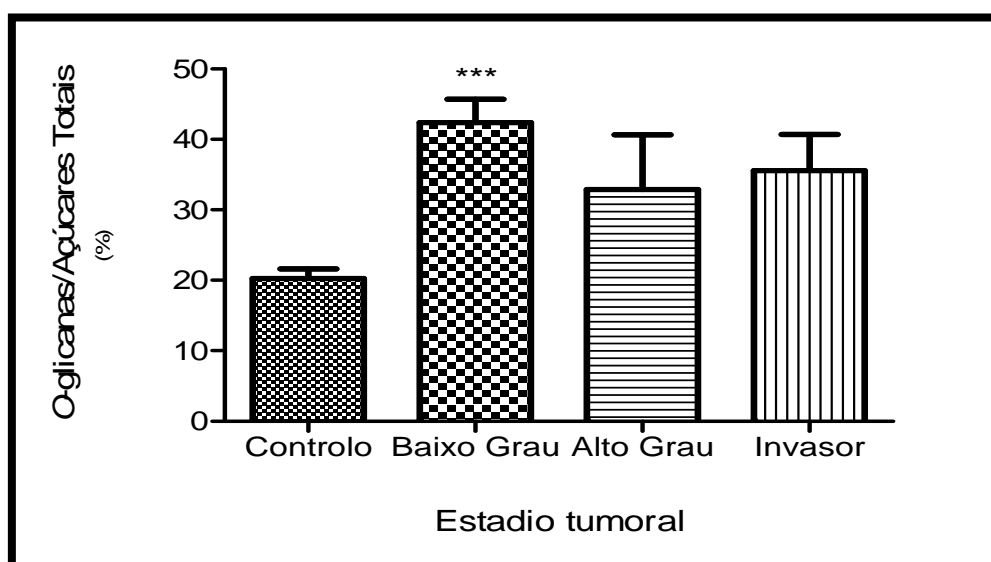


Figura 8 – Razão de *O*-glicanas e açúcares totais de indivíduos controlo e indivíduos com diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

Estas *O*-glicanas foram seguidamente estudadas com mais detalhe com base na sua composição em açúcares neutros. O gráfico da **Figura 9** mostra uma predominância de açúcares neutros constituintes de *O*-glicanas (Fuc, Gal, GalNAc e GlcNAc). Contudo, a presença de Glc sugere a existência de glicoesfingolípidos, glicoconjugados que também contém na sua estrutura Fuc, Gal, GlcNAc e GalNAc. São ainda observáveis quantidades de resíduos de Xil e Man descritos anteriormente como pertencentes a proteoglicanas, *N*-glicanas e/ou glicoproteínas *O*-manosiladas. Assim, o perfil em açúcares neutros demonstra que as amostras, embora enriquecidas em *O*-glicoproteínas, contém também

outros glicoconjugados. Evidencia ainda a necessidade de otimizar o protocolo utilizado de forma a garantir uma separação das várias classes de glicanas acima descritas.

Através do gráfico da **Figura 9** é possível verificar uma diminuição de Fuc, Gal e GlcNAc com a agressividade dos tumores. Estes dados vêm demonstrar que a perda de fucosilação é um fenómeno ubíquo nas glicoproteínas urinárias em tumores de estadio mais avançado (**Figura 6 e 9**). Já a sub-expressão de Gal e GlcNAc poderá traduz características particulares ao nível da O-glicosilação, nomeadamente a sub-expressão de LacNAc (**Figura 6 e 9**).

Este comportamento é acompanhado por um aumento na expressão de GalNAc (**Figura 9**) que poderá resultar de resíduos constituintes do corpo glicosídico de O-glicanas e/ou determinantes do grupo sanguíneo A e AB. No entanto, o estado secretor dos indivíduos em estudo bem como o seu grupo sanguíneo não foi avaliado. Assim, não é possível aferir se as alterações na expressão de GalNAc têm por base estas variáveis. Contudo, Ørntof *et al.* ^[110] descrevem a perda total de expressão de determinantes sanguíneos ABO (H) em tumores do urotélio por supressão na expressão das enzimas responsáveis pela formação destas estruturas. O mesmo fenótipo foi igualmente observado em carcinomas gástricos ^[106], colo-rectal ^[107], ovários ^[109], mama ^[109] e pâncreas ^[109]. Com base nestas considerações será de esperar que o aumento de GalNAc em relação aos outros açúcares esta directamente relacionado com alterações no corpo O-glicosídico.

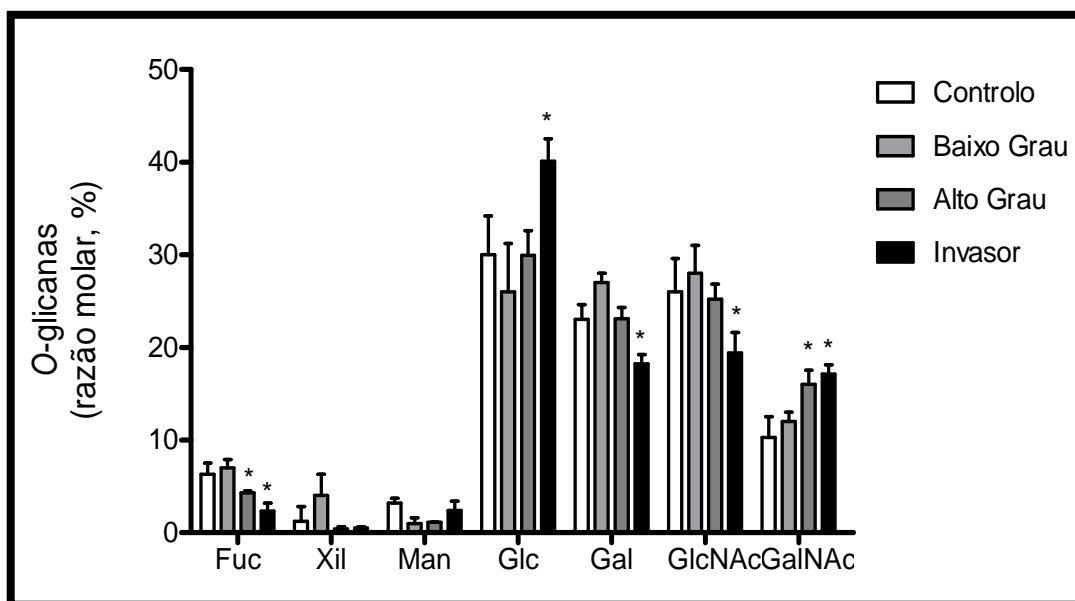


Figura 9 – Razão molar das O-glicanas nos açúcares neutros para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

As alterações descritas são igualmente acompanhadas por um aumento de expressão de *O*-ácidos siálicos nos doentes com cancro de bexiga em relação aos controlos (**Figura 10**). Os dados sugerem um aumento, embora não estatisticamente da expressão de *O*-ácidos siálicos com o estadio tumoral. Contudo este efeito torna-se mais pronunciado, quando comparado com os controlos, apenas nos estadios mais avançados.

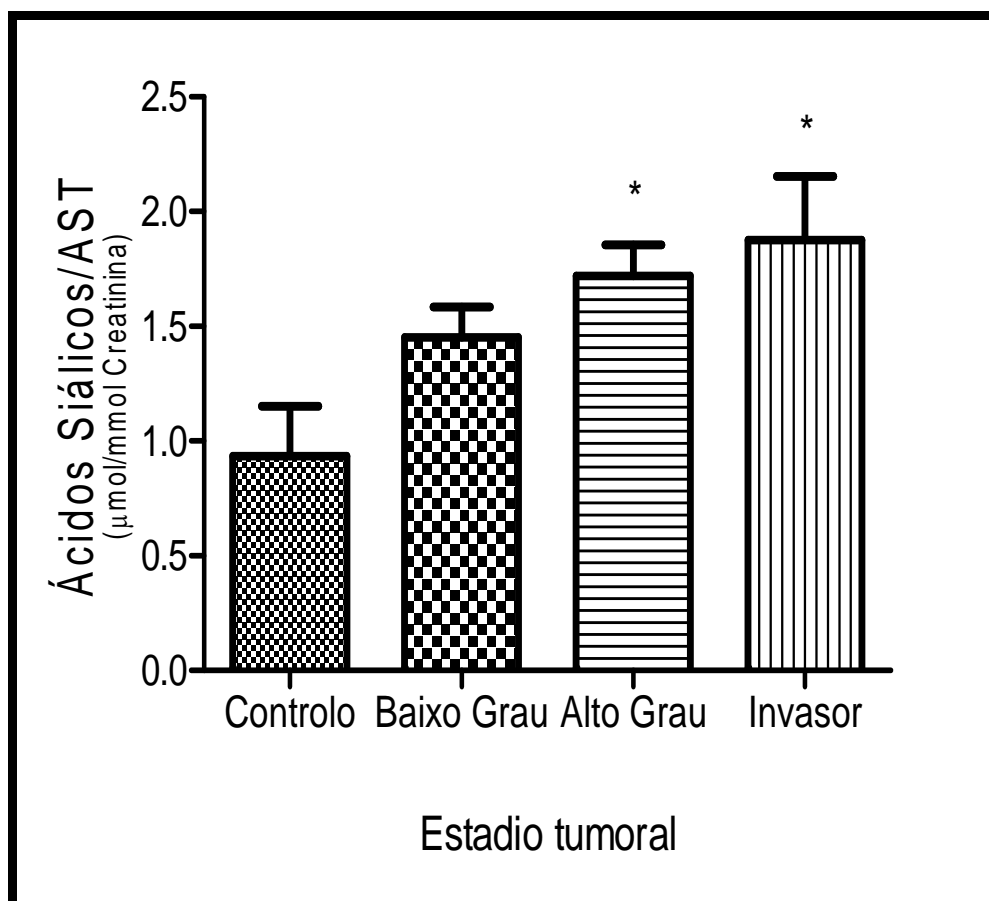


Figura 10 – Razão de ácidos siálicos e ácidos siálicos total para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

Em seguida, foram avaliados os padrões de ligação para cada um dos açúcares apresentados no gráfico da **Figura 9**. Os dados apresentados na **Tabela 4** demonstram as ligações típicas de *O*-glicanas (Fuc, Gal, GlcNAc e GalNAc), proteoglicanos (Xil, GlcNAc, GalNAc, Gal) e esfingolípidos (Glc, Gal, GalNAc e GlcNAc) ^[52], assim confirmando as indicações das análises de açúcares neutros (**Figura 9**)

Entre os açúcares característicos de *O*-glicanas, regista-se uma elevada percentagem de resíduos *O*-3Gal (12,2% a 14,3%) e *O*-4GlcNAc (11,8% a 19,9%) característicos de domínios LacNAc. Estes resíduos apresentam no entanto um decréscimo na expressão nos

estádios dos tumores papilares mais avançados (não-invasivos de alto grau e invasivos), em concordância com o decréscimo na expressão de Gal e GlcNAc observados no gráfico da **Figura 9**. A **Tabela 4** mostra também uma diminuição na expressão de resíduos O-2,3Gal e T-GalNAc nos doentes em relação aos controlos e com o estadio tumoral. Observa-se igualmente um decréscimo na expressão de resíduos O-3Gal para estádios mais avançados. Embora não conclusivas, estas observações reforçam a hipótese de diminuição da expressão de determinantes sanguíneos ABO (H) observada para o tecido tumoral por outros autores ^[110,113-115].

Tabela 4 – Análise do padrão de ligações (Terminal, Linear e Ramificado) de indivíduos controlo e de indivíduos em diferentes estádios tumorais.

	Percentagem Relativa (%)			
	Controlo	Baixo Grau	Alto Grau	Invasor
Tipos de Ligações				
<u>Terminal</u>				
T-Fuc	7.8	5.7	3.3	2.5
T-Glc	10.6	6.7	10	12.7
T-Man	1.4	0.8	1.2	1.2
T-Gal	1.0	2.3	5.4	7.8
T-GlcNAc	1.3	4.3	4.3	1.9
T-GalNAc	5.2	5.4	4.4	4.8
<u>Linear</u>				
1,2Man	4.1	0.7	0.4	0.6
1,2Glc	3.2	3.8	1.5	0.4
1,2Gal	4.0	2.1	1.1	0.9
1,4Gal	0.3	0.6	0.7	0.9
1,4Glc	11.2	15.5	18.6	16.7
1,3Gal	14.3	14.3	14.1	12.2
1,6Man	4.0	2.4	1.5	1.7
1,6Glc	0.2	0.6	2.3	0.5
1,6Gal	1.2	1.3	1.7	1.9
1,3GlcNAc	0.2	0.2	-	0.1
1,3GalNAc	6.4	6.3	5.8	9.6
1,4GlcNAc	15.5	19.9	13.5	11.8
1,6GalNAc	0.1	0.4	1.3	1.9

	Percentagem Relativa (%)			
	Controlo	Baixo Grau	Alto Grau	Invasor
Tipos de Ligações				
Ramificado				
1-2,3Gal	1.5	1.1	0.4	0.2
1-3,4Gal	0.4	0.3	0.2	0.2
1-2,4Gal	0.1	-	-	-
1-2,6Gal	1.2	1.9	1.2	0.5
1-4,6Gal	0.2	0.1	0.3	0.7
1-3,6Man	1.2	0.8	0.1	0.6
1-3,6 Gal	0.6	0.4	0.9	1.6
1-3,6GalNAc	-	0.1	1.7	1.5
1-3,4GlcNAc	2.6	1.3	0.8	1.2
1-4,6GlcNAc	0.2	0.7	3.3	3.4

Paralelamente, o terminal Fuc apresenta-se diminuído nas urinas dos indivíduos com tumores papilares (não-invasivos de baixo e alto graus e invasivos) em relação às urinas de indivíduos controlo e com a evolução do estadio tumoral. Estes açúcares neutros são normalmente observados como terminais de resíduos *O*-2Gal, *O*-2,3Gal e *O*-3,4GlcNAc característicos de estruturas de *Lewis*. Com base na relação entre o somatório dos açúcares neutros acima descritos (T-Fuc, *O*-2Gal, *O*-2,3Gal e *O*-3,4GlcNAc) e o total de açúcares neutros característicos de *O*-glicanas (Fuc, Gal, GlcNAc, GalNAc), foi possível avaliar a evolução da expressão de determinantes de *Lewis* nas amostras estudadas. Estes resultados encontram-se apresentados no gráfico da **Figura 11**, a partir do qual é possível verificar uma diminuição na expressão dos epítomos de *Lewis* na urina de doentes com diferentes estadios tumorais em relação à urina de indivíduos controlo. Esta diminuição também se aplica entre os diferentes estadios tumorais, principalmente entre os tumores de baixo grau e alto grau.

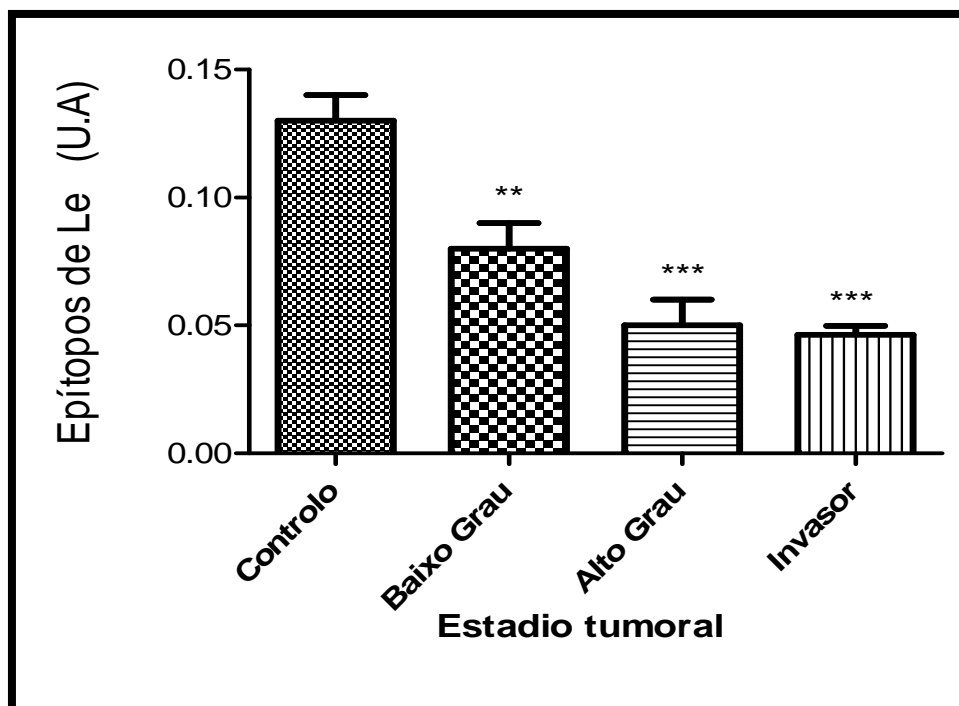


Figura 11 – Quantificação dos epítomos de *Lewis* para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estádios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

Estes resultados vêm confirmar observações já feitas por outros autores ao nível da expressão de epítomos de *Lewis* no tecido ^[97,112], demonstrando assim que a urina poderá reflectir as alterações ocorridas no urotélio.

É ainda de referir que a **Tabela 4** apresenta outros padrões de ligações não específicos das *O*-glicanas. Nomeadamente, as ligações *O*-3GalNAc, *O*-3,4Gal e *O*-4,6GalNAc podem também ser encontradas em esfingoglicolípidos. Já a ligação *O*-4Glc é apenas encontrada em esfingoglicolípidos. A presença deste tipo de ligação sugere uma contribuição deste tipo de estruturas para o padrão total de ligações glicosídicas apresentado. Estes resultados apontam ainda para a necessidade, em futuros estudos, de proceder a uma remoção de estruturas lipídicas.

A **Tabela 4** evidencia ainda vários resíduos em ligações *O*-6 (Gal, GlcNAc, GalNAc) que estão aumentados nos doentes em relação aos controlos e cuja percentagem aumenta com o estadio tumoral. O fenótipo acima descrito encontra-se evidenciado através do estabelecimento de uma razão entre o total de resíduos *O*-6 substituídos apresentados na **Tabela 4** e o total de resíduos pertencentes a *O*-glicanas (Fuc, Gal, GlcNAc, GalNAc) (**Figura 12**). Esta razão demonstra ainda que este efeito é mais acentuado em tumores papilares não-invasivos de alto grau e tumores papilares invasivos.

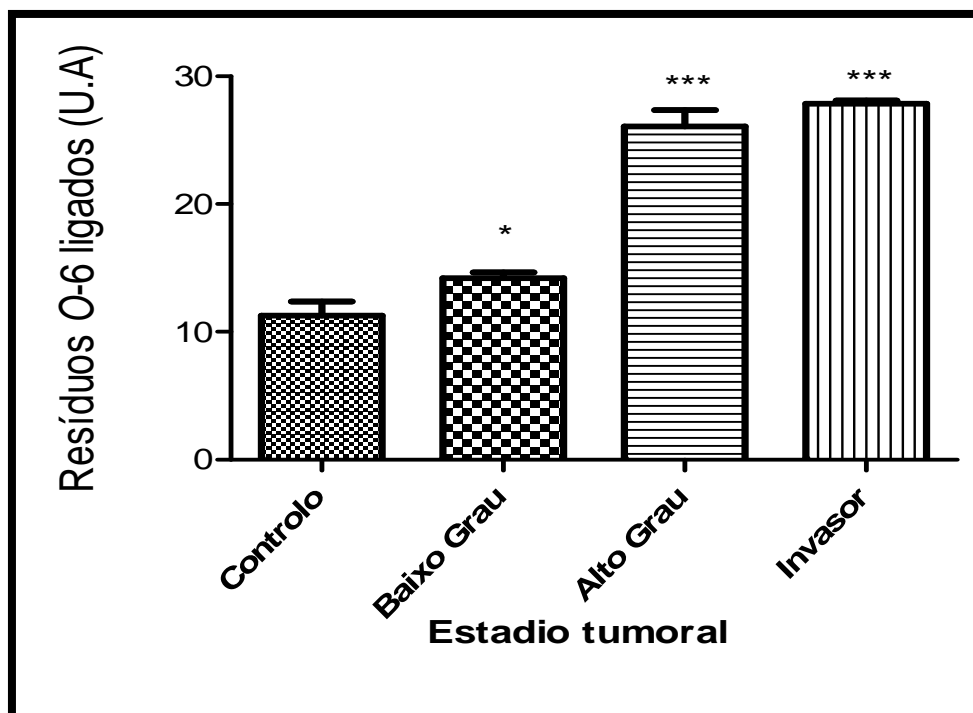


Figura 12 – Resíduos *O*-6 ligados para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

O aumento dos ácidos siálicos observado no gráfico da **Figura 7** associado ao aumento de resíduos em ligação *O*-6 (**Tabela 4**, **Figura 12**) sugere uma elevada expressão de ácidos siálicos em ligação α -2,6. Tal, foi avaliado por *slot blot* usando a lectina *Sambucus nigra* (SNA) onde os dados obtidos estão apresentados no gráfico da **Figura 13**. De acordo com a mesma, pode-se observar um aumento de ligações α -2,6 na urina de doentes com diferentes estadios tumorais em relação às urinas de indivíduos controlo. Estes dados sugerem ainda um aumento, embora não estatisticamente significativo, de ligações α -2,6 na urina entre os diferentes estadios do carcinoma urotelial.

A expressão de ácidos siálicos de ligações α -2,6 no tecido e urina no cancro de bexiga não estão referidos na literatura (**Figura 13**). No entanto, este comportamento encontra-se descrito em outros cancros ^[126,127]. A expressão deste tipo de ligações está normalmente associado à agressividade do tumor papilar e mau prognóstico ^[126,127].

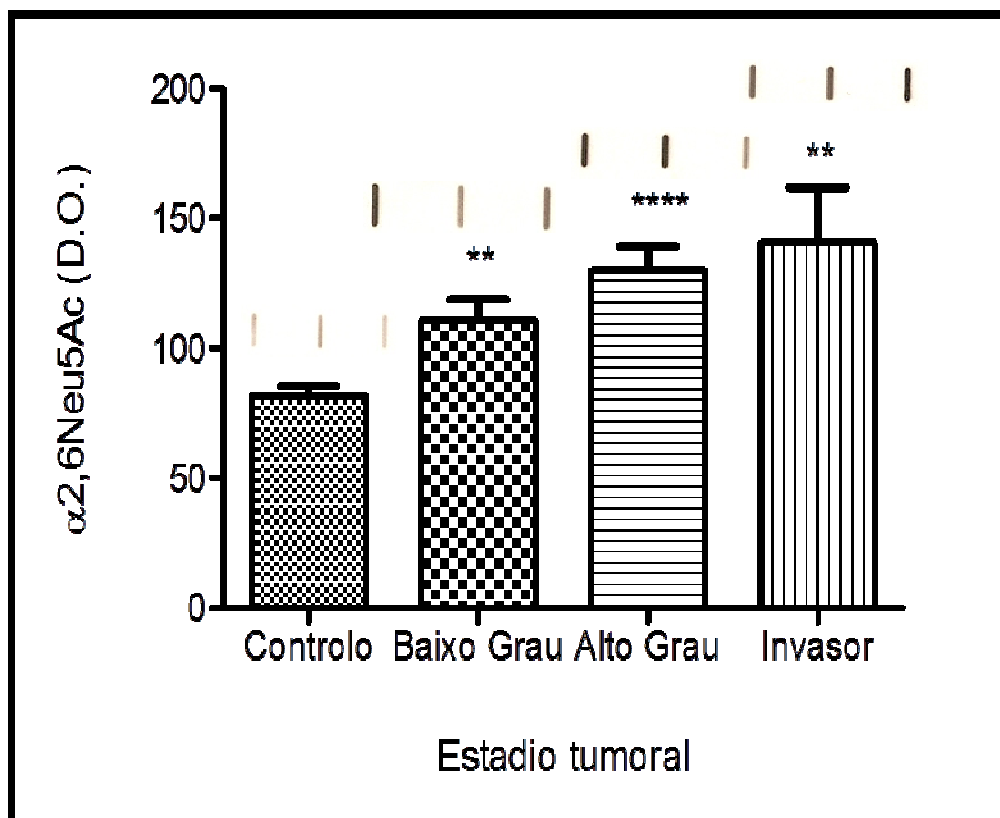


Figura 13 – Quantificação de $\alpha 2,6\text{Neu5Ac}$ para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

Observou-se o aumento das cadeias *O*-6 nos doentes que é essencialmente explicada por um aumento de resíduos de *O*-6GalNAc e *O*-3,6GalNAc, sugerindo a expressão de epítomos sTn e sT característicos de tumores ^[126,127].

Com base nas considerações, procedeu-se a uma avaliação da expressão do epítopo sTn, caracterizado por conter uma ligação α -2,6. De acordo com o gráfico da **Figura 14**, verifica-se um aumento de sTn nas urinas de indivíduos em diferentes estadios tumorais em relação às urinas dos indivíduos controlo. Contudo, só é possível uma diferenciação entre tumores papilares não-invasivos (baixo grau) e tumores papilares invasivos. É ainda importante referir que a expressão de sTn foi avaliado pela primeira vez em urina.

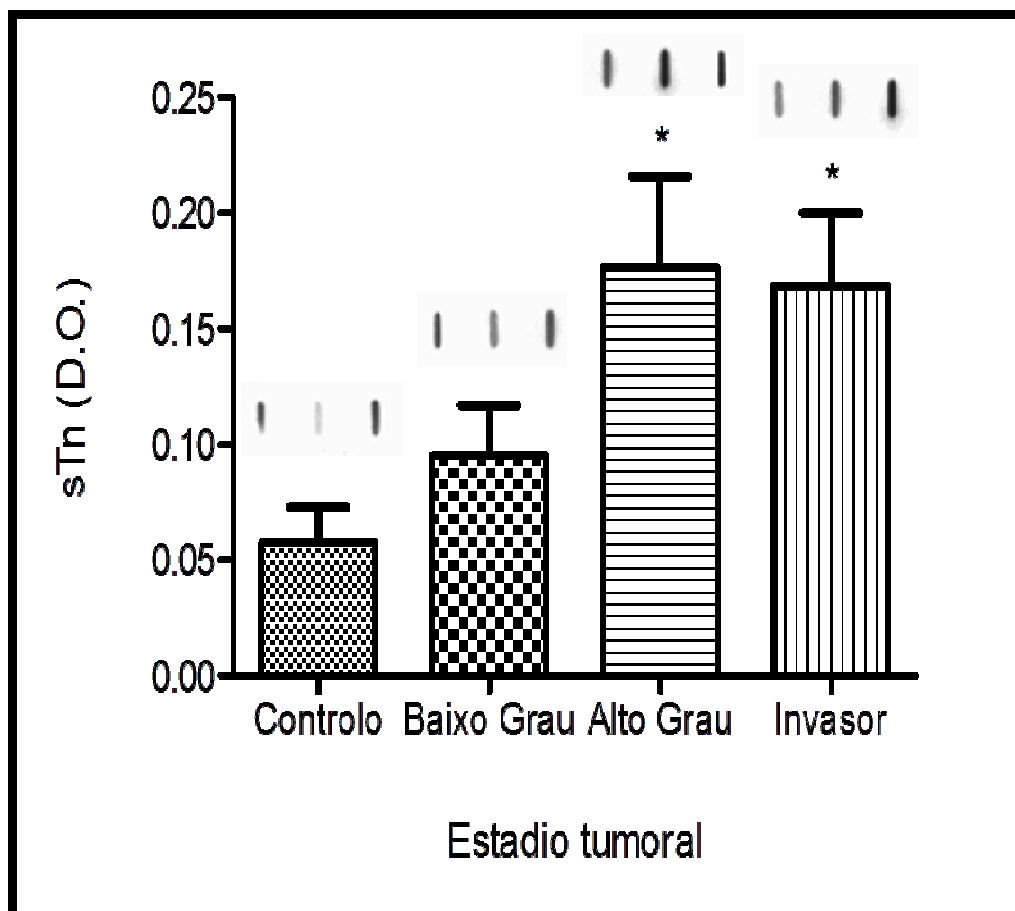


Figura 14 – Avaliação da expressão do epítipo sTn para indivíduos controlo e indivíduos em diferentes estadios tumorais (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs controlo).

O sTn é sintetizado pela enzima sT6GalNAc^[33,74-75], sugerindo uma sobreexpressão desta enzima no tecido. Outros autores sugerem ainda que a formação do epítipo sTn se fica a dever a uma mutação do gene que codifica a *Cosmc*, que inactiva a síntese do corpo glicosídico 1 (GalNAc β 1-3Gal)^[52]. Contudo, os resultados da **Tabela 4** demonstram a existência de resíduos consistentes com a presença do corpo glicosídico 1, reforçando a hipótese de sobreexpressão da sT6GalNAc.

IV. Conclusões e perspectivas futuras

IV. Conclusões e perspectivas futuras

Com este trabalho, conclui-se que há um aumento de proteínas *O*-glicosiladas na urina de doentes com tumores papilares da bexiga. As glicoproteínas isoladas na urina de doentes com tumores papilares de bexiga caracterizam-se por um padrão de *O*-glicosilação diferenciado em relação a indivíduos com ausência de tumor. Em particular, demonstram uma sub-expressão de epítomos de *Lewis* e um aumento na expressão de ácidos siálicos. Estes fenótipos tornam-se mais acentuados nos tumores papilares não-invasivos de alto grau e invasivos. Observou-se igualmente uma sobreexpressão de resíduos *O*-6 substituídos e ácidos siálicos *O*-2, demonstrando a predominância deste tipo de substituição. Em concordância com estas observações, identificou-se um aumento da expressão de epítomos sTn na urina de doentes em estadios mais avançados.

As alterações observadas no padrão de *O*-glicosilação das glicoproteínas urinárias de doentes com tumores papilares de bexiga sugerem o seu potencial enquanto biomarcador tumoral. Os resultados obtidos vêm ainda apontar que os estados tumorais mais avançados são marcados por profundas alterações nos padrões de *O*-glicosilação. Em particular, sugerem uma desregulação na expressão de sialiltransferases, nomeadamente a sT6GalNAc.

Assim, futuros estudos deverão ser conduzidos envolvendo uma população mais abrangente, e caracterizada em relação ao estado secretor e padrões de expressão de *Lewis*. Os padrões de *O*-glicosilação deverão ser avaliados tanto no tecido como na urina e complementados com informação resultante de técnicas de caracterização estrutural como a espectrometria de massa. Também, a abordagem experimental utilizada deverá ser otimizada no sentido de promover um melhor isolamento de *O*-glicanas, nomeadamente através de uma prévia extracção de estruturas lipídicas e proteoglicanos.

Assim, será possível gerar a informação necessária ao direccionamento de estudos para melhor compreensão da desregulação nos processos de *O*-glicosilação no cancro da bexiga.

O conjugar desta informação permitirá igualmente criar bases para identificação de biomarcadores com maior sensibilidade e especificidade para este tipo de tumores.

V. Referências bibliográficas

V. Referências bibliográficas

1. Jemal A, Siegel R, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2010 CA: *A Cancer Journal for Clinicians* 2010;60:277-300.
2. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. *Lancet*. 2009;374:239-49.
3. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol* 2011;59:997-1008.
4. Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003;61:109-18.
5. Trivedi D, Messing EM. Commentary: the role of cytologic analysis of voided urine in the work-up of asymptomatic microhematuria. *BMC Urol*. 2009;9:13.
6. Tetu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*. 2009;22 Suppl 2:S53-9.
7. Garcia Castro M, Fernandez Fernandez E, Martin Corriente MC, Garcia Hernandez S, Alvarez-Arguelles CH. Usefulness of urine cytology for bladder carcinoma diagnosis: comparative study with biopsy. *Actas Urol Esp*. 2008;32:904-7.
8. Van Le, T.-S., R. Miller, et al. Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology* 2005;66(6):1256-1260.
9. Tilki, D., M. Burger, et al. Urine Markers for Detection and Surveillance of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *European Urology* 2011;60(3):484-492.
10. Konety, B. R. and R. H. Getzenberg. URINE BASED MARKERS OF UROLOGICAL MALIGNANCY. *The Journal of Urology* 2001;165(2):600-611.
11. Yossepowitch, O., H. W. Herr, et al. Use of Urinary Biomarkers for Bladder Cancer Surveillance: Patient Perspectives. *The Journal of Urology* 2007;177(4):1277-1282.
12. Lokeshwar, V. B. and M. G. Selzer. Urinary bladder tumor markers. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2006;24(6):528-537.
13. Grossman, H. B., M. L. Blute, et al. The use of urine-based biomarkers in bladder cancer. *Urology* 2007;67(3, Supplement 1):62-64.

14. Fritsche HA, Grossman HB, Lerner SP, Sawczuk I: National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Bladder Cancer. *National Academy of Clinical Biochemistry*.
15. Gutierrez Banos JL, Rebollo Rodrigo MH, Antolin Juarez FM, Martin Garcia B: NMP 22, BTA stat test and cytology in the diagnosis of bladder cancer: a comparative study. *Urol Int*. 2001;66(4):185-190.
16. Gutierrez Banos JL, del Henar Rebollo Rodrigo M, Antolin Juarez FM, Garcia BM. Usefulness of the BTA STAT Test for the diagnosis of bladder cancer. *Urology*. 2001;57:685-9.
17. Landman J, Chang Y, Kavalier E, Droller MJ, Liu BC. Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology*. 1998;52:398-402.
18. Chang YH, Wu CH, Lee YL, Huang PH, Kao YL, Shiau MY. Evaluation of nuclear matrix protein-22 as a clinical diagnostic marker for bladder cancer. *Urology*. 2004;64:687-92.
19. Linder S. Cytokeratin markers come of age. *Tumour Biol*. 2007;28:189-95.
20. Gromov P, Moreira JMA, Gromova I, Celis JE. Proteomic strategies in bladder cancer: From tissue to fluid and back. *Proteomics Clinical Applications*. 2008;2:974-88.
21. Topsakal M, Karadeniz T, Anac M, Donmezer S, Besisik A. Assessment of fibrin-fibrinogen degradation products (Accu-Dx) test in bladder cancer patients. *Eur Urol*. 2001;39:287-91.
22. Schmetter BS, Habicht KK, Lamm DL, Morales A, Bander NH, Grossman HB, et al. A multicenter trial evaluation of the fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer. *J Urol*. 1997;158:801-5.
23. Irmak S, Tilki D, Heukeshoven J, Oliveira-Ferrer L, Friedrich M, Huland H, et al. Stage-dependent increase of orosomucoid and zinc-alpha(2)-glycoprotein in urinary bladder cancer. *Proteomics*. 2005;5:4296-304.

24. Manvar AM, Wallen EM, Pruthi RS, Nielsen ME: Prognostic value of CA 125 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010, 10(12):1877-1881.
25. Yang N, Feng S, Shedden K, Xie X, Liu Y, Rosser CJ, Lubman DM, Goodison S: Urinary glycoprotein biomarker discovery for bladder cancer detection using LC/MS-MS and label-free quantification. *Clin Cancer Res* 2011;17(10):3349-3359.
26. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP, 3rd, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*. 2005;66:35-63.
27. Vrooman OP, Witjes JA. Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol*. 2008;53:909-16.
28. Konety BR, Nguyen TS, Brenes G, Sholder A, Lewis N, Bastacky S, Potter DM, Getzenberg RH: Clinical usefulness of the novel marker BLCA-4 for the detection of bladder cancer. *J Urol* 2000;164(3 Pt 1):634-639.
29. Ostergaard M, Wolf H, Orntoft TF, Celis JE: Psoriasin (S100A7): a putative urinary marker for the follow-up of patients with bladder squamous cell carcinomas. *Electrophoresis* 1999;20(2):349-354.
30. Mutlu N, Turkeri L, Emerk K: Analytical and clinical evaluation of a new urinary tumor marker: bladder tumor fibronectin in diagnosis and follow-up of bladder cancer. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(8):1069-1074.
31. Schmetter BS, Habicht KK, Lamm DL, Morales A, Bander NH, Grossman HB, Hanna MG, Jr., Silberman SR, Butman BT: A multicenter trial evaluation of the 43 fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer. *J Urol* 1997;158(3 Pt 1):801-805.
32. Vestergaard EM, Wolf H, Orntoft TF: Increased concentrations of genotype-interpreted Ca 19-9 in urine of bladder cancer patients mark diffuse atypia of the urothelium. *Clin Chem* 1998;44(2):197-204.
33. Julien S, Krzewinski-Recchi MA, Harduin-Lepers A, Gouyer V, Huet G, Le Bourhis X, Delannoy P: Expression of sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with

the human CMP-Neu5Ac: GalNAc alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalNac I) cDNA. *Glycoconjugate journal*. 2001;18(11-12):883-893.

34. Tim A. Ahles, Andrew J. Saykin, Brenna C. McDonald, Charlotte T. Furstenberg, Bernard F. Cole, Brett S. Hanscom, Tamsin J. Mulrooney, Gary N. Schwartz and Peter A. Kaufman: Cognitive function in breast cancer patients prior to adjuvant treatment. *Breast Cancer Research and Treatment* Volume 110, Number 1, 143-152.
35. Friedrich MG, Hellstern A, Hautmann SH, Graefen M, Conrad S, Huland E, Huland H: Clinical use of urinary markers for the detection and prognosis of bladder carcinoma: a comparison of immunocytology with monoclonal antibodies against Lewis X and 486p3/12 with the BTA STAT and NMP22 tests. *J Urol* 2002;168(2):470-474.
36. Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., and David, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol* 2010;63,322-329.
37. Cao Y, Stosiek P, Springer GF, Karsten U: Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem Cell Biol* 1996;106(2):197-207.
38. Sillanaukee, Pönniö, Jääskeläinen: Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *European Journal of Clinical Investigation* 1999;29(5):413-425.
39. Ebeling FG, Stieber P, Untch M, Nagel D, Konecny GE, Schmitt UM, Fateh-Moghadam A, Seidel D: Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2002;86(8):1217-1222.
40. Inoue M, Ton SM, Ogawa H, Tanizawa O: Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in tumor tissues of the ovary. *Am J Clin Pathol* 1991;96(6):711-716.
41. Itzkowitz S, Kjeldsen T, Frieria A, Hakomori S, Yang US, Kim YS: Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas. *Gastroenterology* 1991;100(6):1691-1700.
42. Itzkowitz SH, Bloom EJ, Kokal WA, Modin G, Hakomori S, Kim YS: Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* 1990;66(9):1960-1966.

43. Hakomori S: Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res* 1989;52:257-331.
44. Bierhuizen MF, Maemura K, Fukuda M: Expression of a differentiation antigen and poly-N-acetyllactosaminyl O-glycans directed by a cloned core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269(6):4473-4479.
45. Burchell JM, Mungul A, Taylor-Papadimitriou J: O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6(3):355-364.
46. Byrd JC, Bresalier RS: Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23(1-2):77-99.
47. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Jarvinen H, Haglund C: Estimating the probability of cancer with several tumor markers in patients with colorectal disease. *Oncology* 2004;66(4):296-302.
48. Chowdhury S, Mandal C: O-acetylated sialic acids: Multifaceted role in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Biotechnology Journal* 2009;4(3):361-374.
49. Duraker N, Celik AN: The prognostic significance of preoperative serum CA 19-9 in patients with resectable gastric carcinoma: comparison with CEA. *J Surg Oncol* 2001;76(4):266-271.
50. Marrelli D, Pinto E, De Stefano A, de Manzoni G, Farnetani M, Garosi L, Roviello F: Preoperative positivity of serum tumor markers is a strong predictor of hematogenous recurrence of gastric cancer. *J Surg Oncol* 2001;78(4):253-258.
51. Yang IJ, Lehotay M, Ogata S, Itzkowitz S: Pathways of Mucin O-Glycosylation in Normal and Malignant Rat Colonic Epithelial Cells Reveal a Mechanism for Cancer-Associated Sialyl-Tn Antigen Expression. *Biological Chemistry* 2001;382(2):219-232.
52. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
53. Tarp, M. A. and H. Clausen. Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects* 2008;1780(3):546-563.

54. Inka, B. Biosynthesis of Complex Mucin-Type O-Glycans. *Comprehensive Natural Products II. M. Editors-in-Chief: Lew and L. Hung-Wen. Oxford, Elsevier 2010*:315-350.
55. Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C: Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol* 2010;28(4):401-408.
56. Clausen, H., and Bennett, E. P. A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology* 1996;6,635-646.
57. Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A., and Tabak, L. A. All in the family: the UDPGalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 2003;13, 1R-16R.
58. Hassan, H., Bennet, E. P., Mandel, U., Hollingsworth, M. A., Clausen, H., Ernst, Hart, and Sinay. O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases, In *Wiley-VCH chapter "Carbohydrates in Chemistry and Biology - a Comprehension Handbook"*, 2000;273-292.
59. Hassan, H., Reis, C. A., Bennett, E. P., Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P., Hollingsworth, M. A., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., and Clausen, H. The lectin domain of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase- T4 directs its glycopeptide specificities. *J Biol Chem* 2000;275,38197-38205.
60. David, L., Nesland, J. M., Clausen, H., Carneiro, F., and Sobrinho-Simoes, M. Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metástases. *APMIS Suppl* 1992;27,162-172.
61. Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G. F., and Karsten, U. Thomsen- Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem Cell Biol* 1996;106,197-207.
62. Kanoh, A., H. Takeuchi, et al. Interleukin-4 induces specific pp-GalNAc-T expression and alterations in mucin O-glycosylation in colonic epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2008;1780(3):577-584.

63. Roth, J., et al., Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation. *Cell*, 1985;43(1): 287-95.
64. Hayes, B.K. and A. Varki, The biosynthesis of oligosaccharides in intact Golgi preparations from rat liver. Analysis of N-linked and O-linked glycans labeled by UDP-[6-3H]N-acetylgalactosamine. *J Biol Chem*, 1993;268(22):16170-8.
65. Gill, D.J., et al., Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *Journal of Cell Biology*, 2010;189(5):843-858.
66. Cao, Y., Schlag, P. M., and Karsten, U. Immunodetection of epithelial mucin (MUC1, MUC3) and mucin-associated glycotopes (TF, Tn, and sialosyl-Tn) in benign and malignant lesions of colonic epithelium: apolar localization corresponds to malignant transformation. *Virchows Arch* 1997;431, 159-166.
67. Springer, G. F., Desai, P. R., Wise, W., Carlstedt, S. C., Tegtmeyer, H., Stein, R., and Scanlon, E. F. Pancarcinoma T and Tn epitopes: autoimmunogens and diagnostic markers that reveal incipient carcinomas and help establish prognosis. *Immunol Ser* 1990;53,587-612.
68. Baldus, S. E., and Hanisch, F. G. Biochemistry and pathological importance of mucin-associated antigens in gastrointestinal neoplasia. *Adv Cancer Res* 2000;79,201-248.
69. Kobayashi, H., Terao, T., and Kawashima, Y. Serum sialyl Tn as na independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian câncer. *J Clin Oncol* 1992;10,95-101.
70. Leivonen, M., Nordling, S., Lundin, J., von Boguslawski, K., and Haglund, C. STn and prognosis in breast câncer. *Oncology* 2001;61,299-305.
71. Kim, G. E., Bae, H. I., Park, H. U., Kuan, S. F., Crawley, S. C., Ho, J. J., and Kim, Y. S. Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pâncreas. *Gastroenterology* 2002;123,1052-1060.
72. Kjeldsen, T., Clausen, H., Hirohashi, S., Ogawa, T., Iijima, H., and Hakomori, S. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2-6 alpha-N-acetylgalactosaminy (sialosyl-Tn) epitope. *Cancer Res* 1988;48,2214-2220.

73. Miles, D. W., Happerfield, L. C., Smith, P., Gillibrand, R., Bobrow, L. G., Gregory, W. M., and Rubens, R. D. Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 1994;70,1272-1275.
74. Sewell, R., Backstrom, M., Dalziel, M., Gschmeissner, S., Karlsson, H., Noll, T., Gatgens, J., Clausen, H., Hansson, G. C., Burchell, J., and Taylor-Papadimitriou, J. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *J Biol Chem* 2006;281,3586-3594.
75. Marcos, N. T., Pinho, S., Grandela, C., Cruz, A., Samyn-Petit, B., Harduin-Lepers, A., Almeida, R., Silva, F., Morais, V., Costa, J., Kihlberg, J., Clausen, H., and Reis, C. A. Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. *Cancer Res* 2004;64,7050-7057.
76. Brockhausen, I., Yang, J., Dickinson, N., Ogata, S., and Itzkowitz, S. H. Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells. *Glycoconj J* 1998;15,595-603.
77. Schietinger, A., Philip, M., Yoshida, B. A., Azadi, P., Liu, H., Meredith, S. C., and Schreiber, H. A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumorspecific antigen. *Science* 2006;314,304-308.
78. Ju, T., and Cummings, R. D. Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome, *Nature* 2005;437,1252.
79. Ju, T., Brewer, K., D'Souza, A., Cummings, R. D., and Canfield, W. M. Cloning and expression of human core 1 beta1,3-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 2002;277,178-186.
80. Ogata, S., Maimonis, P. J., and Itzkowitz, S. H. Mucins bearing the cancer-associated sialosyl-Tn antigen mediate inhibition of natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 1992;52,4741-4746.
81. Springer, G. F. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 1984;224,1198-1206.

82. Avichezer, D., Springer, G. F., Schechter, B., and Arnon, R. Immunoreactivities of polyclonal and monoclonal anti-T and anti-Tn antibodies with human carcinoma cells, grown in vitro and in a xenograft model. *Int J Cancer* 1997;72,119-127.
83. Dalziel, M., Whitehouse, C., McFarlane, I., Brockhausen, I., Gschmeissner, S., Schwientek, T., Clausen, H., Burchell, J. M., and Taylor-Papadimitriou, J. The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *J Biol Chem* 2001;276,11007-11015.
84. Schwientek, T., Nomoto, M., Levery, S. B., Merks, G., van Kessel, A. G., Bennett, E. P., Hollingsworth, M. A., and Clausen, H. Control of O-glycan branch formation. Molecular cloning of human cDNA encoding a novel beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase forming core 2 and core 4. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274,4504-4512.
85. Schwientek, T., Yeh, J. C., Levery, S. B., Keck, B., Merks, G., van Kessel, A. G., Fukuda, M., and Clausen, H. Control of O-glycan branch formation. Molecular cloning and characterization of a novel thymus-associated core 2 beta1, 6-n-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 2000; 275,11106-11113.
86. Kuhns, W., Rutz, V., Paulsen, H., Matta, K. L., Baker, M. A., Barner, M., Granovsky, M., and Brockhausen, I. Processing O-glycan core 1, Gal beta 1-3GalNAc alpha-R. Specificities of core 2, UDP-GlcNAc: Gal beta 1-3 GalNAc-R(GlcNAc to GalNAc) beta 6-N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-sialic acid: Gal beta 1-3GalNAc-R alpha 3-sialyltransferase. *Glycoconj J* 1993;10,381-394.
87. Whitehouse, C., Burchell, J., Gschmeissner, S., Brockhausen, I., Lloyd, K. O., and Taylor-Papadimitriou, J. A transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans. *J Cell Biol* 1997;137,1229-1241.
88. Hagiwara, S., Ohyama, C., Takahashi, T., Endoh, M., Moriya, T., Nakayama, J., Arai, Y., and Fukuda, M. Expression of core 2 beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase facilitates prostate cancer progression. *Glycobiology* 2005;15,1016-1024.

89. Iwai, T., Inaba, N., Naundorf, A., Zhang, Y., Gotoh, M., Iwasaki, H., Kudo, T., Togayachi, A., Ishizuka, Y., Nakanishi, H., and Narimatsu, H. Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide beta1,3-Nacetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277,12802-12809.
90. Cheng, L., Tachibana, K., Zhang, Y., Guo, J., Kahori, T. K., Kameyama, A., Wang, H., Hiruma, T., Iwasaki, H., Togayachi, A., Kudo, T., and Narimatsu, H. Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T10. *FEBS Lett.*2002; 531,115-121.
91. Iwai, T., Kudo, T., Kawamoto, R., Kubota, T., Togayachi, A., Hiruma, T., Okada, T., Kawamoto, T., Morozumi, K., and Narimatsu, H. Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102,4572-4577.
92. Yang, J. M., Byrd, J. C., Siddiki, B. B., Chung, Y. S., Okuno, M., Sowa, M., Kim, Y. S., Matta, K. L., and Brockhausen, I. Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology* 1994;4,873-884.
93. Lu, H., Goodell, V., and Disis, M. L. Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of câncer. *J Proteome Res* 2008;7,1388-1394.
94. Ychou, M., Duffour, J., Kramar, A., Gourgou, S., and Grenier, J. Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA19-9 in patients with gastric câncer. *Dis Markers* 2000;16,105-110.
95. Nam, M. J., Madoz-Gurpide, J., Wang, H., Lescure, P., Schmalbach, C. E., Zhao, R., Misek, D. E., Kuick, R., Brenner, D. E., and Hanash, S. M. Molecular profiling of the immune response in colon cancer using protein microarrays: occurrence of autoantibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3. *Proteomics* 2003;3,2108-2115.
96. Disis, M. L., Pupa, S. M., Gralow, J. R., Dittadi, R., Menard, S., and Cheever, M. A. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast câncer. *J Clin Oncol* 1997;15,3363-3367.

97. Limas, C., and Lange, P. H. Lewis antigens in normal and neoplastic urothelium. *Am. J. Pathol.*, 1985;121:176-183.
98. Hollingsworth, M. A., and Swanson, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat.Rev.Cancer* 2004;4,45-60.
99. Pinho, S., Marcos, N. T., Ferreira, B., Carvalho, A. S., Oliveira, M. J., Santos-Silva, F., Harduin-Lepers, A., and Reis, C. A. Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Lett* 2007;249,157-170.
100. Safi, F., Schlosser, W., Kolb, G., and Beger, H. G. Diagnostic value of CA 19-9 in patients with pancreatic cancer and nonspecific gastrointestinal symptoms. *J Gastrointest Surg* 1997;1,106-112.
101. Ychou, M., Duffour, J., Kramar, A., Gourgou, S., and Grenier, J. Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer. *Dis Markers* 2000;16,105-110.
102. Fernandez Madrid, F. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Lett* 2005;230,187-198.
103. Wandall, H. H., Blixt, O., Tarp, M. A., Pedersen, J. W., Bennett, E. P., Mandel, U., Ragupathi, G., Livingston, P. O., Hollingsworth, M. A., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., and Clausen, H. Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant O-glycopeptide epitopes. *Cancer Res* 2010;70,1306-1313.
104. Limas, C. Detection of urothelial Lewis antigens with monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.*, 1986;125:515-523.
105. Orntoft, T. F., Wolf, H., Clausen, H., Hakomori, S.-I., and Dabelsteen, E. Blood group ABO and Lewis antigens in fetal and normal adult bladder urothelium: immunohistochemical study of Type 1 chain structures. *J.Urol.*, 1987;138:171-176.
106. Victorzon, M., et al., A risk score for predicting outcome in patients with gastric cancer, based on stage, sialyl-Tn immunoreactivity and ploidy - A multivariate analysis. *International Journal of Cancer*, 1996;67(2):190-193.
107. Itzkowitz, S.H., et al., Sialosyl-Tn - a Novel Mucin Antigen Associated with Prognosis in Colorectal-Cancer Patients. *Cancer*, 1990;66(9):1960-1966.

108. Kobayashi, H., T. Terao, and Y. Kawashima, Serum sialyl Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 1992;10(1):95-101.
109. Yonezawa, S., et al., Sialosyl-Tn antigen. Its distribution in normal human tissues and expression in adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol*, 1992;98(2):167-74.
110. Orntoft, T. F., Wolf, H., Watkins, W. M. Activity of the Human Blood Group ABO, Se, H, Le, and X Gene-encoded Glycosyltransferases in Normal and Malignant Bladder Urothelium. *Cancer Res* 1988;48:4427-4433.
111. Heimburg, J., et al., Inhibition of spontaneous breast cancer metastasis by anti-Thomsen-Friedenreich antigen monoclonal antibody JAA-F11. *Neoplasia*, 2006; 8(11):939-48.
112. Langkilde, N. C., Wolf, H., Meldgård, P., Orntoft, T. F., Frequency and mechanism of Lewis antigen expression in human urinary bladder and colon carcinoma patients. *Cancer Res* 1991;63:583-586.
113. Meldgaard, P., Holmes, H. R., Bennett, P. E., Clausen, H., Zeuthen, J., Wolf, H., Orntoft T. F., Blood Group ABO-related Glycosylation of Urothelial Cell Lines Immunocytological, Enzymatic, and Genetic Characterization. *Cancer Res* 1994;54:2440-2447.
114. Ishimura, H., Takahashi, T., Nakagawa, H., et al. N-Acetylglucosaminyltransferase V and β 1-6 Branching N-Linked Oligosaccharides Are Associated with Good Prognosis of Patients with Bladder Cancer. *Cancer Res* 2006;12:2506-2511.
115. Ørntoft, T. F., Meldgaard P., Pedersen, B., et al. The Blood Group ABO Gene Transcript Is Down-Regulated in Human Bladder Tumors and Growth-stimulated Urothelial Cell Lines. *Cancer Res* 1996;56:1031-1036.
116. Inka, B. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects* 1999;1473(1):67-95.
117. Yu, L.G., The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. *Glycoconj J*, 2007;24(8):411-20.
118. Limas C, Lange P. T-antigen in normal and neoplastic urothelium. *Cancer Res* 1986; 58(6):1236-45.

119. Ohyama C. Glycosylation in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2008;13(4):308-13.
120. Packer, N. and N. G. Karlsson. Glycomics: methods and protocols. *New York, Humana Press* 2009.
121. Ferreira, J. A., C. Pires, et al. Bioaccumulation of Amylose-Like Glycans by *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2009;14(6):559-570.
122. Matsuno K, Suzuki S: Simple fluorimetric method for quantification of sialic acids in glycoproteins. *Anal Biochem* 2008;375(1):53-59.
123. Boman, H., H. Hedelin, et al. Newly Diagnosed Bladder Cancer: The Relationship of Initial Symptoms, Degree of Microhematuria and Tumor Marker Status. *The Journal of Urology* 2002;168(5):1955-1959.
124. Johansson B, KisTner S: Proteinuria in patients with uroepithelial tumours with special regard to tumour size, clinical staging and grade of malignancy. *Scand J Urol Nephrol* 1975;9(1):45-49.
125. Akçay, T., D. Konukoğlu, et al. Urinary excretion of sialic acid in patients with superficial bladder tumors. *Cancer Letters* 1994;78(1-3):7-9.
126. T. Sata, J. Roth, C. Zuber, B. Stamm, and P. U. Heitz. Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with *Sambucus nigra* and *Maackia amurensis* lectins. *Am J Pathol*. 1991;139(6):1435–1448.
127. Lin, S., W. Kemmner, et al. Cell Surface α 2,6-Sialylation Affects Adhesion of Breast Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research* 2002;276(1):101-110.

